أ.د. وليد حميد يوسف
أ.د. محمد حسن الحمود

تجارب علميّة في الأحياء

الخليّة ؛ الوراثة ؛ البكتيريا ؛ الطحالب ؛ الفطريّات

العلوم الحياتية






منتدى إقراء الثقافي

تجارب علميّة في الأحياء

الخلية ؛ الوراثة ؛ البكتيريا ؛
الطحالب ؛ الفطريات



الأهليّة للنشر والتوزيع

المملكة الأردنيّة الهاشميّة ، عمّان
وسط البلد ، خلف مطعم القدس
هاتف ٤٦٣٨٦٨٨ ، فاكس ٤٦٥٧٤٤٥
ص. ب : ٧٧٧٢ عمّان / الأردن
e - mail : alahlia@nets.jo

تجارب علمية في الأحياء
الخلية – الوراثة – البكتريا – الطحالب – الفطريات
د. محمد حسن الحمود / د. وليد حميد يوسف

الطبعة العربيّة الأولى ، ٢٠٠٤
حقوق الطبع محفوظة

تصميم الغلاف : **زهير أبو شايب** / الأردن

®

الصفّ الضوئي :
علي الحسيني

العلوم البيولوجيّة

أ.د. محمد حسن الحمود
أ.د. وليد حميد يوسف

تجارب علميّة في الأحياء

الخليّة؛ الوراثة؛ البكتيريا؛
الطحالب؛ الفطريات



مقدمة

يمثل كتاب تجارب علمية في الأحياء Experiments in Biology محاولة علمية بارعة مطلع القرن الجديد لتوفير مرجع رصين في المكتبة الجامعية العربية لطلبة تخصص العلوم الحياتية التطبيقية بالأساس إضافة إلى طلبة كليات الطب البشري وطب الأسنان والطب البيطري والصيدلة والتمريض وكلية العلوم الطبية المساندة.

وقد أعدت التجارب العلمية في ضوء الخبرة العلمية الغزيرة المتراكمة لدى العلماء في جامعات العالم المتقدمة في إعداد مناهج الدراسات البايولوجية Biological Curriculum بهدف تشجيع مشاركة الطالب الجامعي بنفسه في عملية اكتساب المعرفة الإبداعية من خلال الممارسة اليدوية الصارمة في إنجاز مختلف التجارب المختبرية. إن فلسفة إنجاز التجارب المختبرية في حقل العلوم البايولوجية تكمن في إثارة المتعة الشخصية لدى الطالب من أجل اكتشاف المعرفة حول المفاهيم العلمية الأساسية في الأحياء قاطبة واعتبار ذلك من الطرق المثالية في التعليم الجامعي العالي. وأن الهدف الآخر وراء أعداد الدراسات المختبرية التجريبية هو من أجل تكامل إمكانيات التدريس لدى الأستاذ الجامعي مع إثارة قدرات التعلم والمهارات الإبداعية لدى الطالب الجديد.

إن التجارب المختبرية المطروحة في هذا الكتاب الجديد يمكن تكييفها من قبل الأستاذ Instructor لتغطية مختلف الاتجاهات البايولوجية في التدريس الجامعي حيث يوجد عدد كافي من التجارب في مجالات بايولوجية الخلية Cell Biology والوراثة Genetics والتنوع الحيوي Biodiversity (مملكة المونيرا، المملكة النباتية والمملكة

الحيوانية) والبيئة Analysis of Ecosystem والتي يمكن إنجازها على مدى الفصول السنوية. وهناك بعض التجارب المختبرية التي يمكن إنجازها عن طريق الاستعانة بالأمثلة Demonstration وذلك من أجل تقصير الزمن المطلوب لتغطية المفاهيم البايولوجية الأساسية حيث يمكن للطالب أن يتعامل مع النماذج الحية للأحياء بشكل مباشر في أوقات محددة خلال الوقت المخصص في المختبر.

وقد صممت كافة التجارب المختبرية بطريقة تمكن الطالب من أدائها في المختبر بسهولة ملموسة. ولا بد من أن يتعلم الطالب الطريقة العلمية في كتابة التقارير المختبرية Laboratory Reports والذي يشمل عناوين محددة هي مقدمة Introduction وطريقة العمل Procedure والنتائج Results والمناقشة Discussion. وأن القواعد العلمية المتبعة في كل جامعات العالم تؤكد على أهمية أن يحضر الطالب نفسه قبل الدخول إلى صالة المختبر وخاصة قراءة المقدمة الموضوعية Introductory Material وخطوات التجربة العلمية Experimental Procedures وقد يتطلب في بعض الأحيان أن يراجع الطالب الفصول النظرية ذات العلاقة بالتجارب المختبرية ولابد للطالب أيضاً أن يتعلم بلورة التفسيرات الموضوعية Explanations والاستنتاجات الواضحة Conclusions كهدف أساسي ضمن معطيات التفكير الإبداعي.

ويمكن للطالب الماهر أن يصنع المعطيات المعرفية بنفسه من خلال تسجيل نتائج تجاربه ومقارنة ذلك مع النتائج التي يحصل عليها زملاؤه في المختبر ومناقشة ذلك في ضوء المعلومات المتوفرة وراء الاختبارات العلمية التجريبية. ونحن لدينا عقيدة راسخة في أن مشاركة الطالب في البحث عن الظواهر البايولوجية في العمل المختبري هو الأسلوب الأمثل في التدريس الجامعي العالي.

وقد أعد هذا الكتاب بطريقة متقنة تلائم استعماله في التعليم الجامعي في مرحلة البكلوريوس في الجامعات العربية. وقد حاولنا الاعتماد على مراجع علمية عالمية حديثة سواء في شرح المادة أو توثيق المعطيات بالصور التوضيحية مما سهل استيعاب الأدبيات الغزيرة المتوفرة بين أيدينا خلال السنوات الأخيرة.

وقد تمت الإشارة إلى كافة المراجع التي استفدنا منها في تأليف هذا الكتاب تحقيقاً لشروط الأمانة العلمية مما يضع الكتاب في مكانة رفيعة المستوى في المكتبة العربية الجامعية المعاصرة.

نأمل أن نكون قد وفقنا في تقديم هذا المرجع الجديد بشكل مناسب للأجيال الصاعدة من الطلاب في العالم العربي.. ونأمل أن نكون قد أسهمنا في تطوير التدريس الجامعي مستلهمين العزم من التعاليم القرآنية. قال تعالى في سورة النجم آية ٣٩- ٤٢:

﴿وأن ليس للإنسان إلا ما سعى ● وإن سعيه سوف يرى ● ثم يجزيه الجزاء الأوفى ● وأن إلى ربك المنتهى﴾

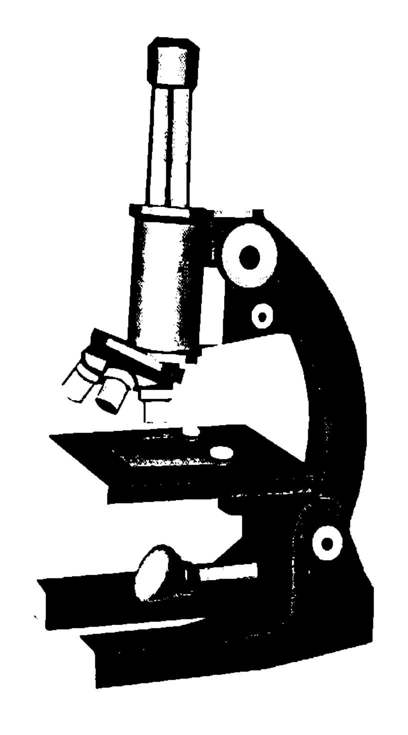
والله ولي التوفيق

المؤلفان

٨/ شباط/ ٢٠٠٢

فهرس المحتويات

الموضوع	الصفحة



المختبر الأول

الجزيئات البايولوجية:

البروتينات والكاربوهيدرات والدهون والحوامض النووية

Biological Important Molecules:

Proteins, Carbohydrates, Lipids and Nucleic Acids

يتألف الجزء الكبير من المادة الجافة dry matter للخلايا من الكاربون والأوكسجين والنيتروجين والهيدروجين والتي تنظم بشكل وحدات صغيرة تدعى المونومرات monomers التي ترتبط مع بعضها لتكوين جزيئات كبيرة تدعى البوليمرات polymers. وتتألف البوليمرات من أربع أنواع هي البروتينات والكاربوهيدرات والدهون والحوامض النووية.

أ - البروتينات Proteins:

إن البروتينات عبارة عن جزيئات كبيرة ومعقدة تتألف من جزيئات صغيرة محتوية على النيتروجين تدعى بالحوامض الأمينية aminoacids. وترتبط هذه الحوامض الأمينية مع بعضها بواسطة أواصر ببتيدية peptide bonds تتكون بين مجموعة الكاربوكسيل لحامض أميني ومجموعة الأمين لحامض أميني آخر. وتدعى التراكيب الناتجة عن تكوين الأواصر الببتيدية بالببتيدات الثنائية dipeptides أو الثلاثية tripeptides او المتعددة polypeptides وذلك اعتماداً على عدد الحوامض الأمينية الموجودة في السلسلة. ويتراوح الوزن الجزيئي للببتيدات المتعددة من حوالي ٥٠٠٠ (كما في الأنسولين insulin) إلى ٤٠ مليون (كما في بروتين فايروس داء فسيفساء التبغ tobacco mosaic virus). وتظهر الجزيئات البروتينية تغايرات غير محدودة في أحجامها وأشكالها وخصائصها الفيزياوية وذلك للأسباب الآتية:

- العدد الكبير للحوامض الأمينية في جزيئة البروتين.
- العدد غير المحدود في الارتباطات combinations المتكونة من الحوامض الأمينية.
- تفاعلية reactivity الجاميع الجانبية لحوامض أمينية معينة.

يتكون جسم الإنسان من الآلاف وربما مئات الآلاف من البروتينات المختلفة. وأن لكل بروتين وظيفة خاصة، كما أن التركيب الكيمياوي لكل بروتين يحدد الوظيفة الخاصة به. ولا توجد منافسات competitors للوظائف التي تقوم بها البروتينات في

الأجهزة الحيوية. وتشكل البروتينات الجزء المهم في تركيب الخلايا حيث تؤلف جزءاً كبيراً من معظم الأغشية الخلوية والعضيات organelles (مثل المايتوكوندريا والبلاستيدات الخضراء chloroplasts والرايبوسومات وألياف المغزل spindle fibers والأنيبيبات الدقيقة microtubules والكروموسومات). وفضلاً عن دور البروتينات التركيبي فإنها تعمل كمحفزات حيوية catalysts (الأنزيمات) تنظم وظائف الخلية والنسيج (الهرمونات)، وتشكل خط الدفاع الرئيس ضد الأحياء الغريبة (الأجسام المضادة antibodies).

١- الاختبارات النوعية للكشف عن البروتينات:

Qualitative Tests to Detect Proteins:

تستعمل التفاعلات الكيمياوية المتضمنة مجاميع الأمين (NH_2 -) والكاربوكسيل (COOH -) الحرة في الجزيئات البروتينية للكشف عن أنواع البروتينات الموجودة في مزيج معقد من الجزيئات. وسيتم التعرف في هذا الجزء من المختبر على عدد من الاختبارات التي تكشف عن وجود الجزيئات البروتينية وكيفية تحديد تركيب الحوامض الأمينية لبروتين الحليب المسمى بالكازين casein. ٪

أ- تفاعل النَنهايدرين Ninhydrin Reaction

إن النَنهايدرين عبارة عن عامل مؤكسد فعال يعمل على إزالة مجاميع الأمين للحوامض الأمينية. ويتحرر من التفاعل الأمونيا ammonia وثنائي أوكسيد الكاربون والشكل المختزل reduced form للننهايدرين. بعدها تتفاعل الأمونيا مع النَنهايدرين والنَنهايدرين المختزل لتكوين لون أرجواني purple color. ويعد ظهور اللون الأرجواني اختباراً موجباً للبروتين. أضف ٣ مليلتر من الماء المقطر إلى أنبوبة اختبار و ٣ مليلتر من محلول زلال البيض egg albumin (١ , ٠ ٪) أو أي بروتين آخر إلى أنبوبة إختبار أخرى.

ثم أضف خلات الصوديوم الصلبة إلى كل أنبوبة اختبار (الكمية تعادل spatula مملوءة بعمق ١ إنج). أضف ثمان قطرات من النَنهايدرين إلى كل أنبوبة. سخن

الأنبوبتين لمدة ٣ دقائق في حمام مغلي ثم برد الأنبوبتين. وسجل ملاحظاتك في الجدول- ١.

الجدول –١: التفاعلات الكيمياوية النوعية للحوامض الأمينية والبروتينات

الاختبار	الأنبوبة	المواد المستعملة	الملاحظات
ننهايدرين	١	ماء مقطر	
	٢	١, ٠٪ زلال البيض أو بروتين آخر	
ساكا كوشي	١	ماء مقطر	
	٢	١٪ زلال البيض أو بروتين آخر	
	٣	١, ٠٪ أرجنين	
بولي	١	ماء مقطر	
	٢	١٠ ملغم/ مل تايروسين	
	٣	١٠ ملغم/ مل كلايسين	
	٤	١٠ ملغم/ مل هستدين	
	٥	المحلول المائي للكازين المتحلل	

ب- اختبار ساكا كوشي Sakaguchi Test

إن المحاليل القلوية للبروتين المحتوية على الحامض الأميني أرجنين arginine تتفاعل مع ألفا- نفثول α-naphthol وهايبوبروميت الصوديوم sodium hypobromite لتكوين لون أحمر شديد. ويختفي هذا اللون بسرعة ما لم يتم تثبيته بإضافة اليوريا

urea . لذا يعد اختبار ساكاكوشي وسيلة نافعة في الكشف عن البروتينات المحتوية على الحامض الأميني أرجنين.

أضف باستعمال الماصة ٣ مل من الماء المقطر إلى أنبوبة الاختبار رقم ١، و ٣ مل من محلول الزلال (١٪) أو أي بروتين آخر إلى أنبوبة الاختبار رقم ٢، و ٣ مل من محلول الأرجنين (٠,١٪) إلى أنبوبة الاختبار رقم ٣. أضف ١ مل من هيدروكسيد الصوديوم (10 N) إلى كل أنبوبة، ثم ١مل من محلول ألفا- نفثول (٠,٠٢٪). أضف قطرتين من هايبوبروميت الصوديوم إلى الأنبوبة رقم ١ يعقبها وخلال ١٠ ثواني إضافة ١ مل من محلول اليوريا (٤٠٪). أعد هذه العملية على الأنبوبتين رقم ٢ و ٣ ثم سجل ملاحظاتك في الجدول-١.

جـ - اختبار بولي Pauly Test

عند وجود الحامض الأميني تايروسين tyrosine أو هستدين histidine أو كليهما في المحلول المائي البروتيني المتحلل protein hydrolysate (ناتج عن التحلل المائي الأنزيمي للبروتين) فإنهما يتفاعلان في محلول قلوي مع حامض السلفانيليك sulfanilic acid لتكوين لون أحمر شديد. ولا يوجد حامض أميني آخر يتفاعل مع هذا الكاشف. لذا يعد هذا الاختبار مهماً في التثبت من وجود الهستدين أو التايروسين أو كليهما في جزيئة البروتين.

أضف ٢ مل من الماء المقطر إلى الأنبوبة رقم ١، و ٢ مل من التايروسين (١٠ ملغم/ مل) إلى الأنبوبة رقم ٢، و ٢ مل من الكلايسين (١٠ ملغم/ مل) إلى الأنبوبة رقم ٣ و ٢ مل من الهستدين (١٠ ملغم/ مل) إلى الأنبوبة رقم ٤، و ٢ مل من المحلول المائي للكازين المتحلل casein hydrolysate (بروتين الحليب) إلى الأنبوبة رقم ٥. أضف ١ مل من كاشف حامض السلفانيليك و ١ مل من نتريت الصوديوم (٥٪) لكل أنبوبة. إمزج الأنابيب واتركها لمدة ٣٠ دقيقة. أضف لكل أنبوبة ٣ مل من كاربونات الصوديوم (٢٠٪) ثم امزج. سجل ملاحظاتك تلك في الجدول-١.

٢- التعيين الكيمياوي الكمي للبروتين
Quantitative Chemical Determination of Protein

إن البايوريت Biuret عبارة عن جزيئة صغيرة يتم تحضيرها من اليوريا، ويحتوي البايوريت على ما يمكن اعتباره أصرتين ببتديتين، لذا فإنه يماثل من حيث التركيب لببتيد ثلاثي بسيط. وعندما يتفاعل البايوريت مع كبريتات النحاس يتكون لون أرجواني شديد نتيجة للتفاعل بين أيونات النحاس والأواصر الببتيدية وتعطي البروتينات تفاعل بايوريت بسبب احتوائها على أعداد كبيرة من الأواصر الببتيدية ويمكن استعمال تفاعل بايوريت لتعيين تراكيز البروتينات في المواد بسبب احتواء معظم البروتينات على العدد نفسه من الأواصر الببتيدية لكل غرام. وفي هذه التجربة سيقوم الطالب بتعيين التركيز المجهول unknown لمحلولين بروتينيين باستعمال المقياس اللوني colorimetrically من خلال قياس شدة اللون الناتج عن تفاعل بايوريت ومقارنته مع تركيز معلوم لبروتين زلال المصل البقري bovine serum albumin.

١- حضر خمس أنابيب اختبار تحتوي كل أنبوبة على ٥ مل من تراكيز متصاعدة من زلال المصل البقري (الجدول – ٢) وحضر أيضاً أنبوبتي اختبار تحتوي كل واحدة منهما على ٥ مل من تراكيز مجهولة من محاليل بروتينية متشابهة أو مختلفة.

٢- أضف ٢,٥ مل من كاشف بايوريت لكل أنبوبة ثم أمزج من خلال تدوير الأنابيب بين راحتي اليدين. حيث يلاحظ تكون اللون بشكل كامل خلال ٣٠ دقيقة ويبقى ثابتاً لفترة ساعة على الأقل. وفي أثناء انتظار تكون اللون يتم معايرة جهاز مقياس اللون باستعمال الأنبوبة ١ والتي تحتوي على ٥ مل من الماء المقطر و ٢,٥ مل من كاشف بايوريت. ثبت الجهاز على طول موجي ٥٤٠ نانومتر. وبعد معايرة الجهاز باستعمال blank يتم حساب النسبة المئوية للنفاذية (٪T) percent transmittance للأنابيب ٢-٥. سجل القراءات في الجدول- ٢. حوّل النسبة المئوية للنفاذية إلى امتصاصية absorbance للأنابيب ٢-٥ باستعمال الجدول –٣ ، بعدها رتب المعلومات للحصول على منحنى المعايرة standard curve (التركيز) لزلال المصل البقري. وباستعمال هذا المنحنى حدد تراكيز المحاليل البروتينية المجهولة.

الجدول -٢: مخطط يوضح التقدير الكمي للبروتين

الأنبوبة	البروتين (زلال المصل البقري)		كاشف بايوريت (مل)	النفاذية (٪)	الامتصاصية
	الحجم (مل)	التركيز (مايكروغرام/ مل)			
١ (blank)	٥	صفر (ماء)	٢,٥	١٠٠	صفر
٢	٥	٢٥٠	٢,٥		
٣	٥	٥٠٠	٢,٥		
٤	٥	١٠٠٠	٢,٥		
٥	٥	٢٠٠٠	٢,٥		
المجهول ١	٥		٢,٥		
المجهول ٢	٥		٢,٥		

٣- فصل الحوامض الأمينية بطريقة الكروماتوكرافي
Chromatographic Separation of Amino Acids

توجد عدة طرق لفصل البروتينات والحوامض الأمينية وتنقيتها. ومن التقنيات البسيطة في هذا المجال هي الكروماتوكرافي chromatography.

وفي هذه الدراسة سيستعمل الطالب كروماتوكرافي الطبقة الرقيقة لفصل الحوامض الأمينية وتشخصها في المحلول المائي للكازين المتحلل. وفي حالة الإمكان شراء صفائح plates كروماتوكرافية مغطاة مسبقاً بالسيليكا – جيل silica- gel لغرض استعمالها في هذه التجربة. كما ويمكن استعمال الطريقة الآتية لتغطية الشرائح الزجاجية العائدة للطالب بالسيليكا ـ جيل.

١- امسك شريحة زجاجية glass slide من حافاتها واغمرها في إناء يحتوي على السيليكا جيل، بعدها تدور الشريحة عدة مرات ثم تدفع إلى الأعلى بكل عناية (الشكل – ١).

٢- جفف الشريحة في الهواء (ملاحظة: أن غطاء السيليكا ـ جيل الأبيض يكون هش لذا يجب عدم تلف السطح).

٣- اختر جانب الشريحة ذو السطح الأملس. بعدها أزل السيليكا جيل من الجانب الآخر للشريحة من خلال مسحه بمنشفة ورقية. (ملاحظة: تجنب التماس المتزايد للشريحة وذلك خوفاً من تلوث الشريحة بالحوامض الأمينية الموجودة في الزيوت أو الدهون الموجودة في سطح جلد الأيدي، لذا يجب مسك الشريحة من حافاتها).

٤- ضع الشريحة بحيث يكون السطح المغطى بالسيليكا جيل إلى الأعلى. ضع إشارة على السطح المغطى عند نقطتين بينهما مسافة ١٢ مليمتر تقريباً وعن أسفل الشريحة بمسافة ٦ مليمتر. أضف قطرة صغيرة من المحلول المائي للكازين المتحلل إلى النقطة ١ (spot 1) باستعمال أنبوبة شعرية. وأضف إلى النقطة ٢ (spot 2) قطرة صغيرة من حوامض أمينية معروفة (حامض الأسبارتيك aspartic acid، حامض الكلوتاميك glutamic acid الميثيونين methionine، البرولين proline، التايروسين tyrosine، الهستدين histidine، الألانين alanine أو اللايسين lysine). وسوف يُعطى كل طالب في الصف أحد الحوامض الأمينية المعروفة.

٥- اترك البقع أو النقاط لكي تجف. بعدها ضع الشريحة بعناية في وعاء الكروماتوكرافي المحتوي على المذيب والغطاء. وعندما تتحرك الحافة الأمامية leading edge للمذيب (solvent front) لمسافة ٦- ١٢ مليمتر من الحافة العليا للسيليكا جيل (٣٠- ٤٥ دقيقة) اسحب الشريحة من الوعاء واتركها لكي تجف.

٦- رش سطح الشريحة بالننهايدرين في موقع جيد التهوية.

تحذير: لا تستنشق الأبخرة ولا تدع الرذاذ يدخل العين واستعمل واقية للعين وقناع للأنف والفم.

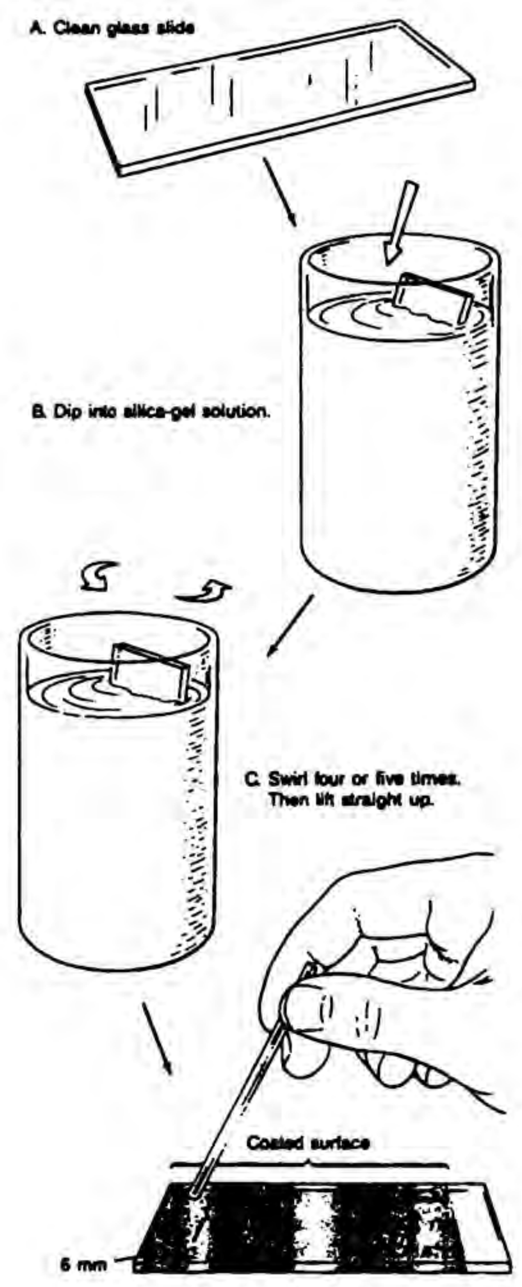
اترك الشريحة لكي تجف، ثم سخن الشريحة لمدة دقيقتين أو ثلاث دقائق. إن الحوامض الأمينية في المحلول المائي المتحلل ستتفاعل مع الننهايدرين وتظهر بشكل بقع ملونة على الشريحة. وينتج عن اختبار الننهايدرين ألوان أرجوانية

مع معظم الحوامض الأمينية ولون أصفر مع الحامض الأميني برولين. سجل ألوان البقع على المخطط اللوني chromatogram في الجدول-٤.

جدول- ٣: تحويل نسبة transmittance إلى absorbance

%T	Absorbance (A)				%T	Absorbance (A)			
	(.00)	1 (.25)	2 (.50)	3 (.75)		(.00)	1 (.25)	2 (.50)	3 (.75)
1	2.000	1.903	1.824	1.757	51	.2924	.2903	.2882	.2861
2	1.699	1.648	1.602	1.561	52	.2840	.2819	.2798	.2777
3	1.523	1.488	1.456	1.426	53	.2756	.2736	.2716	.2696
4	1.398	1.372	1.347	1.323	54	.2676	.2656	.2636	.2616
5	1.301	1.280	1.260	1.240	55	.2596	.2577	.2557	.2537
6	1.222	1.204	1.187	1.171	56	.2518	.2499	.2480	.2460
7	1.155	1.140	1.126	1.112	57	.2441	.2422	.2403	.2384
8	1.097	1.083	1.071	1.059	58	.2366	.2347	.2328	.2310
9	1.046	1.034	1.022	1.011	59	.2291	.2273	.2255	.2236
10	1.000	.989	.979	.969	60	.2218	.2200	.2182	.2164
11	.959	.949	.939	.930	61	.2147	.2129	.2111	.2093
12	.921	.912	.903	.894	62	.2076	.2059	.2041	.2024
13	.886	.878	.870	.862	63	.2007	.1990	.1973	.1956
14	.854	.846	.838	.831	64	.1939	.1922	.1905	.1888
15	.824	.817	.810	.803	65	.1871	.1855	.1838	.1821
16	.796	.789	.782	.776	66	.1805	.1788	.1772	.1756
17	.770	.763	.757	.751	67	.1739	.1723	.1707	.1691
18	.745	.739	.733	.727	68	.1675	.1659	.1643	.1627
19	.721	.716	.710	.704	69	.1612	.1596	.1580	.1565
20	.699	.694	.688	.683	70	.1549	.1534	.1518	.1503
21	.678	.673	.668	.663	71	.1487	.1472	.1457	.1442
22	.658	.653	.648	.643	72	.1427	.1412	.1397	.1382
23	.638	.634	.629	.624	73	.1367	.1352	.1337	.1322
24	.620	.615	.611	.606	74	.1308	.1293	.1278	.1264
25	.602	.598	.594	.589	75	.1249	.1235	.1221	.1206
26	.585	.581	.577	.573	76	.1192	.1177	.1163	.1149
27	.569	.565	.561	.557	77	.1135	.1121	.1107	.1083
28	.553	.549	.545	.542	78	.1079	.1065	.1051	.1037
29	.538	.534	.530	.527	79	.1024	.1010	.0996	.0982
30	.532	.520	.516	.512	80	.0969	.0955	.0942	.0928
31	.509	.505	.502	.498	81	.0915	.0901	.0888	.0875
32	.495	.491	.488	.485	82	.0862	.0848	.0835	.0822
33	.482	.478	.475	.472	83	.0809	.0796	.0783	.0770
34	.469	.465	.462	.459	84	.0757	.0744	.0731	.0719
35	.456	.453	.450	.447	85	.0706	.0693	.0680	.0667
36	.444	.441	.438	.435	86	.0655	.0642	.0630	.0617
37	.432	.429	.426	.423	87	.0605	.0593	.0580	.0568
38	.420	.417	.414	.412	88	.0555	.0543	.0531	.0518
39	.409	.406	.403	.401	89	.0505	.0494	.0482	.0470
40	.398	.395	.392	.390	90	.0458	.0446	.0434	.0422
41	.387	.385	.382	.380	91	.0410	.0398	.0386	.0374
42	.377	.374	.372	.369	92	.0362	.0351	.0339	.0327
43	.367	.364	.362	.359	93	.0315	.0304	.0292	.0281
44	.357	.354	.352	.349	94	.0269	.0257	.0246	.0235
45	.347	.344	.342	.340	95	.0223	.0212	.0200	.0188
46	.337	.335	.332	.330	96	.0177	.0166	.0155	.1044
47	.328	.325	.323	.321	97	.0132	.0121	.0110	.0099
48	.319	.317	.314	.312	98	.0088	.0077	.0066	.0055
49	.310	.308	.305	.303	99	.0044	.0033	.0022	.0011
50	.301	.299	.297	.295	100	.0000	.0000	.0000	.0000

Note: Intermediate values can be arrived at by using the .25, .50, and .75 columns. For example, if %T equals 85, the absorbance equals .0706; if %T equals 85.75, the absorbance equals .0667.



شكل-١ : فحص الحوامض الأمينية بطريقة الكروماتوكرافي

الجدول- ٤: كروماتوكرافي الحوامض الأمينية

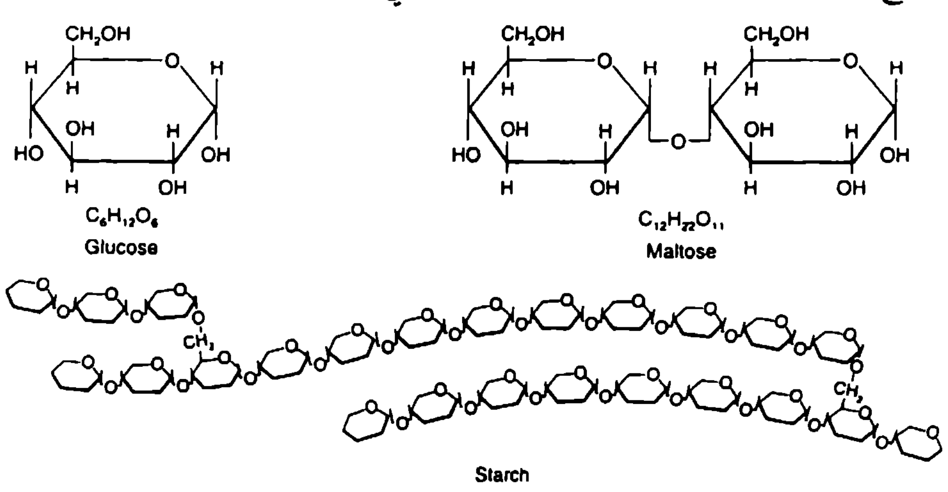
الحامض الأميني	لون البقعة	المسافة التي تحركها المذيب	المسافة التي تحركتها البقعة	قيمة R_f
حامض الأسبارتيك				
حامض الكلوتاميك				
الميثيونين				
البرولين				
التايروسين				
الهستدين				
الألانين				
اللايسين				

عيّن مركز كل بقعة حامض أميني ثم احسب المسافة التي تحركتها البقعة إلى أعلى الشريحة من النقطة التي وضعت فيها . وأن هذه المسافة التي يتم تقسيمها على المسافة الكلية التي تحركها المذيب من خط البداية تعرف بقيمة R_f (R_f value). ويمكن استعمال قيمة R_f لتشخيص الحوامض الأمينية المفصولة من مزيج معين. سجل ملاحظاتك وملاحظة بقية الطلبة في الجدول- ٤.

ب ـ الكاربوهيدرات Carbohydrates:

يشير مصطلح الكاربوهيدرات إلى مائيات الكاربون 'hydrate of carbon' ويستعمل هذا الاسم لأن الكاربوهيدرات تتضمن العديد من المركبات المحتوية على ذرات الهيدروجين والأوكسجين بالنسب نفسها الموجودة في الماء (ذرتي هيدروجين وذرة أوكسجين). لذا فإن الصيغة العامة للكاربوهيدرات هي $C(H_2O)n$، حيث تمثل

n عدد وحدات C(H₂O)n. وتوجد الكاربوهيدرات بشكل جزيئات بسيطة نسبياً تدعى السكريات sugars أو جزيئات معقدة من النشا starch والسيليلوز cellulose. وتتكون معظم الكاربوهيدرات من وحدات أساسية ذات ست ذرات كاربون (السكريات) مرتبطة مع بعضها بطرق متعددة. وتقسم الكاربوهيدرات إلى ثلاث مجاميع تبعاً لعدد الوحدات السداسية الكاربون التي تحتويها:



شكل- ٢: تركيب الكربوهيدرات

أ- السكريات الأحادية monosaccharides التي تتألف من جزيئة سداسية الكاربون واحدة والمثال على ذلك الكلوكوز glucose.

ب- السكريات القليلة oligosaccharides التي تتألف من اثنين أو أكثر من السكريات الأحادية المرتبطة سوية، فالسكروز sucrose عبارة عن سكر ثنائي disaccharide مكون من جزيئة كلوكوز مرتبطة مع جزيئة فركتوز fructose.

جـ- السكريات المتعددة polysaccharides التي هي عبارة عن بوليمرات مكونة من عدة سكريات مرتبطة مع بعضها سوية. فالنشا والكلايكوجين عبارة عن سكريات متعددة طويلة ذات سلاسل مكونة من جزيئات الكلوكوز تعمل كمواد مخزونة للكاربوهيدرات. فالنشا يتكون عادة من النباتات أما الكلايكوجين فيتكون في الحيوانات.

يمكن التعرف على الكاربوهيدرات من خلال التفاعلات اللونية باستعمال كواشف خاصة. ويمكن لهذه الاختبارات تحديد الكمية التقريبية وكذلك نوع الكاربوهيدرات الموجودة في المادة من خلال قياس التغيرات اللونية التي يتم الحصول عليها باستعمال تراكيز مختلفة من الكاشف قيد الاختبار. وتستلزم معظم هذه الطرق تسخين الكاربوهيدرات والكاشف سوية في حمام مائي حار hot- water bath ويفضل إجراء الطريقة على جميع الكاربوهيدرات في الحمام المائي نفسه في الوقت نفسه بحيث يمكن إجراء مقارنة مباشرة للاستجابة النسبية لجميع الكاربوهيدرات في الاختبار.

وفي هذه الدراسة سيتم التعرف على اختبارين أو أكثر شائعة الاستعمال للكشف عن وجود أنواع معينة من الكاربوهيدرات. وسيطلب من كل طالب التعرف على تركيب الكاربوهيدرات لمحلول مجهول يحتوي على نوع واحد أو أكثر من الكاربوهيدرات. وأن الكاربوهيدرات التي سيتم اختبارها ستكون موجودة في العينة المجهولة. ويجب أن يجري الاختبار على العينة المجهولة في الوقت نفسه مع العينة المعلومة من الكاربوهيدرات.

١- اختبارات السكريات المختزلة Tests for Reducing Sugars

إن السكر المختزل هو ذلك السكر الذي يحتوي على مجموعة الديهايد حرة أو فعالة free aldehyde group

$$-C\begin{matrix}// \\ \backslash\end{matrix}$$

أو مجموعة كيتون Ketone group

$$>C=O$$

وفي محلول ذي رقم هيدروجيني pH عالي فإن هذه السكريات يمكنها اختزال المواد المؤكسدة الضعيفة مثل أيونات النحاسيك cupric ions والفضة silver ions

والفيريسيانيد ferricyanide. فعلى سبيل المثال تتفاعل أيونـات النحاسيك Cu^{+2} مـع الكلوكوز لتكوين راسب ملون من أوكسيد النحاسوز cuprous oxide. وسيكون لون الراسب بين الأخضر والبني المحمر reddish brown، وهذا يعتمد علـى كميـة السـكر المختزل الموجودة.

$$\text{Glucose} + Cu(OH)_2 \xrightarrow{\text{حرارة}} Cu_2O + H_2O + \text{oxidized glucose}$$

كلوكوز — هيدروكسيد النحاسيك — راسب ملون — ماء — سكر مؤكسد

أ- اختبار بندكت Benedict's Test

يحتـوي كاشـف بنـدكت علـى بيكربونـات الصـوديوم وسـترات الصـوديوم وكبريتات النحاس. فعندما يرتبط كاشف بندكت مع سكر مختزل (مثل الكلوكـوز او الفركتوز) ثم يسـخن فـإن أيـون النحاسـيك (Cu^{+2}) لكبريتـات النحـاس ($CuSO_4$) سـيختزل إلى أيـون النحاسـوز (Cu^{+}) في أوكسـيد النحـاس (Cu_2O) والـذي يكـون راسب.

ضع ٥ مل من كاشف بندكت في أنبوبـة اختبـار ثـم أضـف (٨) قطـرات مـن محلول السكر المراد اختباره (بتركيز ١٪) . سخن المحتويات لمدة دقيقتين على مصـباح بنزن Bunsen burner (لا تستعمل الغليان) ثم اتركهـا لكـي تـبرد إلى درجـة حـرارة المختبر.

تحذير: ابعد النهاية المفتوحة للأنبوبة عن نفسك وعن الآخرين.

وهناك طريقة أخرى بديلة وهي وضع أنبوبة الاختبار في حمام مائي مغلي لمدة ٣ دقائق ثم تركها لكي تبرد إلى درجة حرارة المختبر. ويفضل استعمال الطريقة الأخيرة في حالة إجراء اختبار لعدد من السكريات. سجل لون الراسب المتكون لكل نوع من السكريات وكميته في الجدول -٥. استعمل إشارة (+) للإشارة إلى الكمية القليلة من الراسب و (+ +) للكمية المعتدلة و (+ + +) للكمية الكبيرة.

الجدول – ٥: اختبارات السكر النوعية

السكريات	الملاحظات	
	اختبار بندكت	اختبار بارفويد
كلوكوز		
فركتوز		
كالاكتوز		
مانوز		
زايلوز		
لاكتوز		
مالتوز		
سكروز		
نشا		
السكر المجهول		

ب- اختبار بارفويد Barfoed's Test

يستعمل اختبار بارفويد للتمييز بين السكريات الأحادية والسكريات القليلة وإن هذا الكاشف يماثل كاشف بندكت باستثناء كونه حامضياً قليلاً، إذ يتراوح رقمه الهيدروجيني ٤,٥. فعند هذا الرقم الهيدروجيني pH فإن السكريات القليلة Oligosaccharides عند تسخينها لمدة دقيقتين لا تختزل أيون النحاسيك Cu^{+2} إلى أوكسيد النحاسوز Cu_2O، بينما تعمل السكريات الأحادية على اختزال أيون النحاسيك. وأن تسخين السكريات القليلة أكثر من دقيقتين قد يؤدي إلى حدوث بعض الاختزال بسبب تكوين السكريات الأحادية بعملية التحلل المائي hydrolysis.

لذا يجب معاملة جميع السكريات بالطريقة نفسها ويجب ملاحظة الراسب في الوقت الدقيق.

لاختبار سكر معين، ضع ٥ مل من كاشف بارفويد في أنبوب اختبار ثم أضف ٠,٥ مل من محلول ١٪ من السكر. امزج المحلولين بشكل جيد. ضع أنابيب الاختبار في حمام مائي مغلي لمدة دقيقتين. وأن ظهور راسب أحمر من أوكسيد النحاسوز خلال ١-٢ دقيقة يشير إلى اختبار موجب للسكريات الأحادية. دوّن النتائج في الجدول-٥ ولاحظ وقت ظهور الراسب.

٢- الكاربوهيدرات المجهولة Unknown Carbohydrates:

يمكن تحديد فيما إذا كانت العينة المجهولة تحتوي على سكر أحادي أو سكر قليل من خلال استعمال اختباري بندكت وبارفويد. وتثبت من صحة نتائجك مع مدرس الموضوع.

جـ - الدهون Lipids:

إن الدهون عبارة عن مجموعة مختلفة من مواد شحمية أو زيتية غير ذائبة في الماء وذائبة في مذيبات الشحوم fat solvents (مثل الإيثر والأسيتون ورابع كلوريد الكاربون). وتمثل الكليسيريدات الثلاثية triglycerides أبسط أنواع الدهون ومنها الزبد butter وزيت جوز الهند coconut oil والشحوم الحيوانية والنباتية. وتتكون الكليسيريدات الثلاثية من الكاربون والأوكسجين ويتكون عند تحللها مائياً الكليسرول glycerol والحوامض الشحمية (الشكل- ٣). وتحتوي الكليسيريدات الثلاثية على نسبة عالية من أواصر الكاربون- هيدروجين بالمقارنة مع الكاربوهيدرات وبذلك تتحرر منها كمية كبيرة من الطاقة في أثناء عملية الأكسدة مقارنة مع بقية المواد العضوية. فالشحوم fats مثلاً تحرر ضعف السعرات التي تحررها كمية مماثلة من الكاربوهيدرات. أما الدهون الفسفورية phospholipids فهي عبارة عن كليسيريدات ثلاثية استبدل فيها أحد الحوامض الشحمية بمجموعة فوسفات سالبة الشحنة. وتمثل الدهون الفسفورية المكون الرئيس لمعظم الأغشية الخلوية والتي

تسيطر على حركات الدهون غير الغشائية والمواد الذائبة في الدهون من الخلايا وإليها. وسيقوم كل طالب في هذا المختبر بفصل المستخلص الدهني إلى مكونات من الحوامض الشحمية باستعمال كروماتوكرافي الطبقة الرقيقة.

$$\begin{array}{l} H_2C-O-CO-C_{17}H_{35} \\ HC-O-CO-C_{17}H_{35} \\ H_2C-O-CO-C_{17}H_{35} \end{array} \xrightarrow[\text{Hydrolysis}]{H_2O} \begin{array}{l} H_2C-OH + C_{17}H_{35}COOH \\ HC-OH + C_{17}H_{35}COOH \\ H_2C-OH + C_{17}H_{35}COOH \end{array}$$

Lipid   Glycerol + 3 fatty acids

الشكل- ٣: التحلل المائي hydrolysis للدهون إلى الكليسرول والحوامض الشحمية

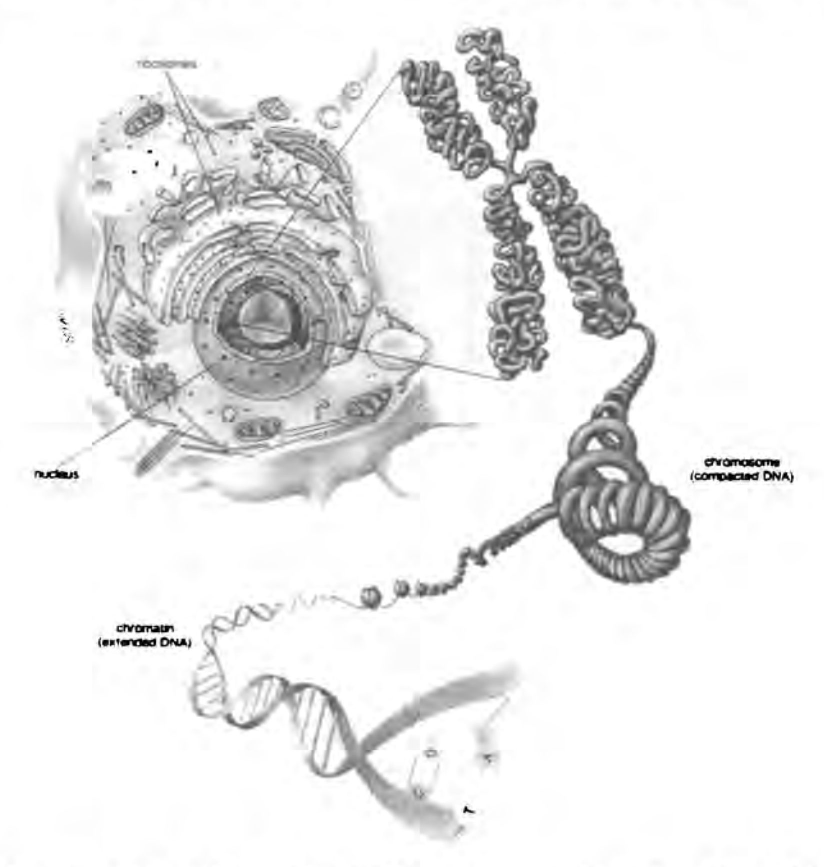
ضع الشريحة بحيث يكون سطحها المغطى إلى الأعلى. ضع نقطة من المستخلص الدهني المتحلل مائياً hydrolyzed على السطح المغطى بمسافة ٦ ملم عن الجزء السفلي من الشريحة واترك هذه النقطة لكي تجف. بعدها ضع الشريحة بدقة في وعاء الكروماتوكرافي المحتوي على المذيب الدهني وغطي الوعاء بغطاء. وعندما يتحرك المذيب لمسافة ٦- ١٢ ملم من الحافة العليا للجيل gel (٣٠- ٤٥ دقيقة)، اسحب الشريحة من الوعاء، ودع الشريحة لكي تجف خلال ٤- ٥ دقائق. بعدها ضع الشريحة في وعاء يحتوي على بلورات اليود ثم غطه لحين ظهور نقط أو بقع spots بنية على سطح السيليكا جيل.

إن الحوامض الشحمية هي الوحيدة التي تتحرك في هذا المذيب. أما بقية المكونات الموجودة في المستخلص فإما أنها لا تمتص على السيليكا جيل أو أنها تبقى في موقعها . فعلى سبيل المثال سوف يلاحظ وجود الكليسيريدات الثلاثية عند حافة المذيب وستبقى الدهون الفسفورية في موقعها. حدد مواقع هذه المكونات على الشريحة.

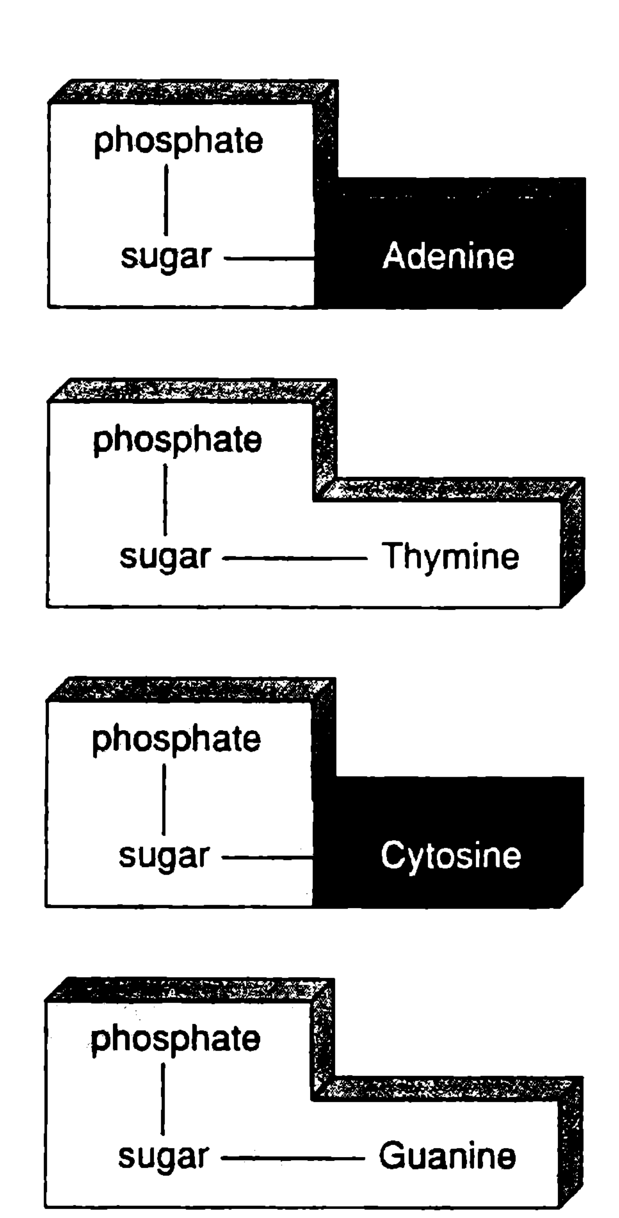
د - الحوامض النووية Nucleic Acids:

سميت الحوامض النووية بهذا الاسم لأنها وجدت في نوى نطف الأسماك من قبل ميشر Miescher عام ١٨٧٤. وتحتوي جميع الخلايا على نوعين منها هما الحامض النووي الرايبوزي مزال الأوكسجين deoxyribonucleic acid (DNA) والحامض النووي الرايبوزي ribonucleic acid (RNA). ويتألف DNA من:

١- قواعد البيورين النيتروجينية purine (الأدنين adenine والكوانين guanine)

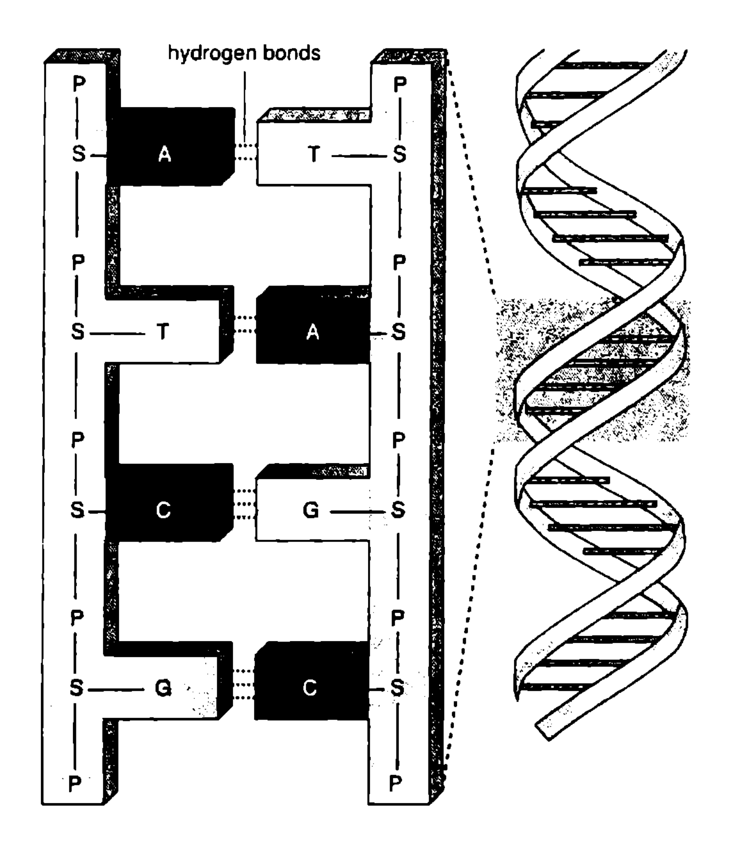


شكل- ٤: موقع الحامض النووي DNA وتركيبه. إن هذا الحامض النووي موجود بشكل كروموسوم ولكنه يمتد بشكل خيوط كروماتينية خلال مرحلة الطور البيني. وأنها خلال مرحلة الطور البيني فإنه يمكن من الناحية التقنية استخلاص الحامض النووي DNA من الخلية حتى يدرس تركيبه ووظيفته.



شـــكل- ٥: تركيـــب الحـــامض النـــووي DNA. هنـــاك أربعـــة أنـــواع مـــن النيوكليوتيـدات nucleotides وهـي جزيئـات تحـوي علـى سـكر خماسـي ومجموعـة فوسفات مع قاعدة نيتروجينية واحدة إما أن تكون:

أ- أدنين adenine
ب- ثايمين thymine
جـ- سايتوسين cytosine
د - كوانين guanine.



شـكل- ٦: تركيـب الحـامض النـووي DNA بشـكل شـريط مـزدوج double stranded وعند فتحه فإنه يشبه السلم. لاحظ أن القواعد النيتروجينية ترتبط بأواصر هيدروجينية ضعيفة مع بعضها. إن الشريط المزدوج يلتف على نفسه مكوناً double helix.

٢- قواعـد البيرميـدين النيتروجينيـة pyrimidine (السايتوسـين cytosine والثـايمين thymine).

٣- سكر البنتوز المسمى دي أوكسي رايبوز deoxyribose.

٤- حامض الفوسفوريك.

أما RNA فإنه يتألف من الوحـدات التركيبيـة السـابقة نفسـها باسـتثناء وجـود البيرميدين المسمى يوراسيل uracil بدلاً من الثايمين، وسكر الرايبوز ribose بدلاً مـن

الدي أوكسي رايبوز. ويوجد DNA بشكل رئيس في النواة، أما RAN فيتـوفر بكثـرة في السايتوبلازم كما أنه يوجد في نويات nucleoli النواة.

إن وجود الرايبوز في RNA والـدي أوكسـي رايبـوز في DNA يمكـن الاسـتفادة منهما في التعرف على هذه الحوامض النووية والتمييز بينهمـا. وأن المقيـاس اللـوني للون الأخضر الذي يتم الحصول عليه عند تفاعل الرايبوز مع كاشف بايل أورسينول Bial's Orcinol Reagent يمكن الاستفادة منه بوصفه اختباراً كمياً للرايبـوز وكـذلك RNA الذي تحلل منه هذا الرايبوز مائياً. أما الدي أوكسي رايبوز فيمكن تقديره كمياً من خلال قياس اللون الأزرق المتكون من تفاعل الدي أوكسي رايبـوز مـع كاشـف ديشيه داي فنيل أمين Dische Diphenylamine Reagent.

يمكن استعمال كواشف الأورسينول والداي فنيـل أمـين مباشـرة علـى محاليـل DNA , RNA وذلك لأن الحـوامض القويـة في هـذه الكواشـف تعمـل علـى تحليـل الحـوامض النوويـة مائيـاً إلى السـكريات والقواعـد وحـامض الفوسـفوريك. وان السكريات هي التي تتفاعل مع الكاشـف المناسـب لتكـوين اللـون. وأن السـكريات المرتبطة بقواعد البيرمدين لا تتفاعل تحت هذه الظروف وذلك لأن الأصرة التي تربط السكر بقاعدة البيرمدين تكون مقاومة للتحلل المائي. ونظراً لوجود قواعد البيـورين والبيرميدين في الحوامض النووية بنسبة ١ : ١ تقريباً، فإن مـا يقـارب نصـف السـكر الكلي في العينة يتم قياسه تحت هذه الظروف. وفي هذا الجزء من التجربة سوف يقوم كل طالب بتحضير مستخلصات RNA و DNA من نسيج طحال البقر. وسوف يـتم اسـتعمال تفـاعلات بايـل وديشـيه المـذكور سـابقاً لقيـاس كميـةRNA و DNA في المستخلصات من خلال المقارنـة اللونيـة مـع كميـات معلومـة مـن هـذه الحـوامض النووية.

١- استخلاص DNA:

تكون كمية DNA في معظم الخلايا قليلة لذا فمن الضروري اختيـار النسـيج أو العضو الذي يحتوي على خلايا ذات نسبة نواة إلى السايتوبلازم عالية (أي نوى كبيرة

محاطة بكمية قليلة نسبياً من السايتوبلازم). وتعد الخلايا اللمفاوية المصادر المثالية لاستخلاص DNA. لذا فإن الأنسجة اللمفاوية مثل الطحال والغدة الصعترية thymus gland تستعمل بشكل روتيني وذلك لاحتواء هذه الأعضاء على أعداد كبيرة من الخلايا اللمفاوية. وفي هذه التجربة سيتم استعمال الطحال أو الغدة الصعترية المأخوذة من الأبقار في المجزرة. (ملاحظة: يجب أن تتم عملية الاستخلاص بكاملها خلال فترة مختبرية واحدة. وفي حالة عدم إمكان ذلك فيجب إكمال الخطوات الستة الأولى بعدها يوضع المستخلص في دورق يعلم باسم الطالب ويجمد لحين إكمال الخطوات ٧- ١٠).

١- سيعطيك المدرس مكعبات من نسيج الطحال أو الغدة الصعترية البقرية المجمدة. زن بدقة ١٥ غم من النسيج وأعد الزائد إلى المدرس.

٢- اسكب ١٥٠ مل من محلول citrate buffer solution المبرد (٤°م) (الرقم الهيدروجيني ٧,٢ -٧,٤) إلى داخل خلاط blender مبرد . أضف مكعبات النسيج المجمدة إلى الخلاط لغرض مجانستها. وتمثل هذه أفضل طريقة لتكسير الخلايا وأغشيتها النووية لتحرير محتويات السايتوبلازم والنواة. وتستمر عملية الخلط لمدة ٣٠- ٦٠ ثانية بعد إضافة آخر مكعب نسيجي. ويستعمل محلول citrate buffer لتثبيط فعالية الأنزيمات الخلوية المحللة لـ DNA (DNases) والتي تتحرر من اللايسوسومات في أثناء عملية المجانسة homogenization. وتحتاج فعالية هذه الأنزيمات إلى أيونات المغنيسيوم (Mg^{+2}). وأن للسترات ألفة قوية لأيونات المغنيسيوم حيث ترتبط بهذه الأيونات وبذلك تمنع أنزيمات DNases من إبطال فعالية DNA في أثناء عملية الاستخلاص. كما أن إجراء عملية الاستخلاص بدرجة حرارة صفر – ٤°م يمنع فعالية هذه الأنزيمات.

٣- اسكب محلول المجانسة homogenate في أنبوبة الطرد المركزي واعمل طرد مركزي لمدة ١٥ دقيقة بسرعة 4000× G. وأن الهدف من إجراء الطرد المركزي لمحلول المجانسة هو لفصل الخلايا غير المتكسرة والبقايا والدي أوكسي رايبونيوكليوبروتين deoxyribonucleoprotein (DNP) الذي يحتوي على

البروتينـات النوويـة nucleoproteins (البروتينـات protamines والهسـتونات histones) المرتبطة بجزيئة DNA. وأن الدي أوكسـي رايبونيوكليوبروتين يكـون غير ذائب في محلول citrate buffer بينما يكون RNA ذائباً تحت هـذه الظـروف وسيكون موجوداً في السائل الطافي supernatant.

٤- تخلص بدقة من السائل الطـافي وحـدد حجمـه وجمـده لاسـتعماله فيمـا بعـد في استخلاص RNA.

٥- بعد سحب السائل الطافي اغسل الراسب من خلال إضافة كمية كافية من محلول citrate buffer البارد إلى أنبوبة الطرد المركزي لكي يمتلـيء مـا يقـارب نصـفها. اغلق الأنبوبة بسـداد ورجهـا لبضـع دقـائق لتجزئـة الراسـب. وعنـدما يتجـزأ الراسب تعاد عملية الطرد المركزي لمدة ١٥ دقيقة وبسرعة 4000×G.

٦- تخلص من السـائل الطافي ثم أضـف كلوريـد الصـوديوم (2.6M تركيـزه حـوالي ١٥٪) إلى ما يقارب نصف أنبوبة الاختبار. اسـتعمل قضـيب زجـاجي لتجزئـة الراسب ثم أغلق الأنبوبة بسداد ورجها بقوة لبضع دقائق لإذابة DNP والـذي يكـون ذائبـاً في كلوريـد الصـوديوم (2.6M). كمـا ويقـوم كلوريـد الصـوديوم بتفكيك البروتينات النووية (البروتامينات والهستونات) من DNP لتكوين DNA الحر. وتكوّن البروتينات النووية راسباً دقيقاً يمكن إزالته بجهـاز الطـرد المركـزي باستعمال سرعة عالية بحيث يبقى DNA ذائباً في السائل الطافي. ولغرض إذابـة جميـع DNA في العينـة اسـكب المحلـول المعلـق suspension في خـلاط blender لغرض مجانسته لمدة دقيقة واحدة. وعندما يكـون المحلـول المعلـق كثيـف القـوام أضف كمية قليلة من كلوريد الصوديوم (2.6M). وفي حالة وجود تجمعـات أو كتل فيجب مجانسة المحلول المعلق لمدة ٣٠ ثانية أخرى. ويمكـن تحويـل محتويـات أنبوبة الاختبار إلى بيكر سعة ٢٥٠ مل ويتم مزج المحلول المعلق لـمدة ١٠ دقـائق باستعمال المحراك المغناطيسي magnetic stirrer. (ملاحظة، يمكن في هذه المرحلـة إيقاف الطريقة وتجميد المستخلص إلى المختـبر القـادم. وفي حالـة وجـود وقـت كاف بما يقارب السـاعة استمر في الخطوة ٧).

٧- انقل مستحضر DNP إلى أنبوبة الطرد المركزي واعمل طرد مركـزي بسـرعة ×G 20.000 لمدة ٢٠ دقيقة لترسيب البروتين. وإذا كـان المستحضـر جامـداً فيجب تذويبه أولاً.

٨- انقل السائل الطافي المحتوي على DNA الذائب إلى بيكـر سـعة ٥ مـل. وفي هـذه الحالة يمكن ترسيب DNA من خلال الإضـافة البطيئـة لحجمـين مـن الكحـول الأثيلي (٩٥٪) على السطح الداخلي لجدار الأنبوبة والذي يكـون طبقـة فـوق السائل الطافي. ويلاحظ تكون كتلة من مادة ليفية بيضاء عند منطقة تماس محلول DNA والكحول الأثيلي (الأيثانول ethanol). حرك الراسب باستعمال قضـيب زجاجي لكي يخترق الكحول السائل الطـافي. وحالما تقـوم بهـذه العمليـة فـإن الراسب DNA سيلتف حول القضيب الزجاجي. استمر بهذه العمليـة إلى الحـد الذي لا يمكن فيه ملاحظة إضافة الراسب على القضيب الزجاجي.

٩- انقل القضيب الزجاجي مع DNA المترسب إلى دورق flask سعة ٢٥٠ مل. أضف ٢٠٠ مل من الماء المقطر وأغلق الدورق بسـداد وابـدأ بـالرج. وفي خـلال دقـائق قليلة فإن DNA سيذوب من القضيب الزجاجي لتكوين محلول لزج عديم اللون، ويمكن استعمال المحراك المغناطيسي magnetic stirrir عند الضرورة.

١٠- انقـل ٥ مـل مـن محلـول DNA إلى أنبوبـة اختبـار واعـطِ البـاقي إلى المـدرس للاحتفـاظ بـه. وباسـتعمال العينـة ذات ٥ مـل يمكنـك قيـاس تركيـز DNA في المستحضر باستعمال تفاعل داي فنيل أمين.

٢- الكشف عن DNA باستعمال تفاعل ديشيه داي فنيل امين
DNA Detection by the Dische Diphenylamine Reaction

يمكن الاستفادة من وجود الدي أوكسي رايبـوز لتشـخيص DNA وتمييـزه عـن الحامض النووي الرايبوزي RNA الذي يحتوي على الرايبوز. كما ويمكن تقدير تركيز DNA كمياً من خلال قياس شدة اللون الأزرق المتكـون نتيجـة للتفاعـل بـين الـدي اوكسي رايبوز وكاشف ديشيه داي فنيل أمين.

١- حضر حامل أنابيب اختبار يحتوي على ستة أنابيب اختبار مرقمة من ١- ٦. وأن الأنابيب ١- ٥ سوف تستعمل لأعداد منحنى تركيز DNA القياسي. كما وأن الأنبوب ٥ ستستعمل بوصفها blank control أما الأنبوبة ٦ فستحتوي على محلول DNA ذو تركيز مجهول.

٢- أذب ٥ ملغم من DNA التجاري في ٥ مل ماء مقطر. وهذا سيمثل محلول DNA القياسstock DNA solution المحتوي على ١ ملغم DNA/ مل.

٣- ضع ٢ مل من محلول الـ DNA القياسي في أنبوبتين رقم ١ و ٢. ثم ضع ٢مل من الماء المقطر في الأنابيب ٢و ٣و ٤و ٥. امزج محتويات الأنبوبة ٥ ثم انقل ٢ مل إلى الأنبوبة ٣. وامزج محتويات الأنبوبة ٣ ثم انقل ٢ مل إلى الأنبوبة ٤. امزج الأنبوبة ٤ بشكل جيد وتخلص من ٢ مل. ضع ٢ مل من محلول DNA المجهول في الأنبوبة ٦. وأن كل أنبوبة يجب أن تحتوي الآن على ٢ مل من المحاليل المذكورة في الجدول – ٦.

الجدول- ٦: مخطط يوضح التقدير الكمي لـ DNA

الأنبوبة	المحتويات والتركيز	النفاذية %	الامتصاصية
١	DNA (١ ملغم/ مل)		
٢	DNA (٠,٥ ملغم/ مل)		
٣	DNA (٠,٢٥ ملغم/ مل)		
٤	DNA(٠,١٢٥ ملغم/ مل)		
٥	ماء مقطر (صفر، السيطرة)		
٦	مستحضر DNA المجهول		

٤- ضع ٤ مل من كاشف ديشيه داي فنيل أمين في كل أنبوبة من الأنابيب الستة وامزج محتوياتها. ضع جميع الأنابيب في حمام دافيء مغلي لمدة ١٠ دقائق. وفي

أثناء تسخين هذه الأنابيب حضر حمام ثلجي ice bath بوضع ثلج مجروش في بيكر سعة ٥٠٠ مل مضافاً إليه الماء إلى حد ثلثي البيكر. وبعد تسخين الأنابيب الستة انقلها إلى الحمام الثلجي وحركها بهدوء لمدة ٥ دقائق لتبريد محتوياتها بسرعة.

٥- شغّل جهاز المقياس اللوني colorimeter واتركه لمدة ٥ دقائق. ثبت الصفيحة المدرجة أو اللوحة المدرجة dial بحيث تقرأ صفر ٪ نفاذية transmittance عند طول موجي ٥٠٠ نانومتر. ضع أنبوبة السيطرة (الأنبوبة ٥) في ماسك الأنبوبة قرب الغطاء، وثبت المسيطر الضوئي حتى تقرأ اللوحة المدرجة نفاذية ١٠٠٪. حرك الأنبوبة ثم حدد النسبة المئوية لنفاذية الأنابيب ١و ٢و ٣و ٤. حوّل هذه القراءات إلى امتصاصية (A) باستعمال الجدول ١- ٣. سجل هذه المعلومات في الجدول-٦.

٦- ارسم منحنى DNA القياس من خلال امتصاصية الأنابيب ١و ٢و ٣و ٤ وتراكيز DNA المعروفة في كل أنبوبة. وباستعمال هذا المنحنى القياسي حدد تركيز DNA في المستحضر المجهول.

٣- استخلاص RNA من طحال البقر

هناك عدد من الطرق لاستخلاص RNA من الأنسجة. وأن التقنية المستعملة في هذه التجربة هي ليست بدرجة التعقيد نفسها كما هو الحال في بقية الطرق بل أنها تفي بالغرض لتحضير RNA. وأن مستحضر RNA يكون نوعاً غير نقي impure، وان الناتج الذي يتم الحصول عليه يكون أقل مما هو عليه في الطرق الأخرى.

١- ذوّب السائل الطافي الذي تم الحصول عليه في الخطوة ٤ من الجزء ء- ١. أضف حجم مساوي من حامض الخليك ثلاثي الكلور trichloroactic acid (٣٠٪) المبرد (٤°م). حرك المزيج بهدوء واتركه لمدة ٥ دقائق.

تحذير: يعد حامض الخليك ثلاثي الكلور TCA من الحوامض القوية لذا يجب اتخاذ الحيطة والحذر عند التعامل به ويجب ارتداء النظارات الوقائية).

٢- اعمل طرد مركزي بسرعة G× 2000 لمدة خمس دقائق لجمع الراسب المتكون. تخلص من السائل الطافي. املأ نصف الأنبوبة بأسيتون بارد (٤ °م) وامزج المحتويات. أعد عملية الطرد المركزي بسرعة G × 2000 لمدة ٥ دقائق وتخلص من السائل الطافي وأضف مرة أخرى أسيتون بارد. أعد الطرد المركزي وتخلص من السائل الطافي وأضف في هذه الحالة أسيتون بدرجة حرارة المختبر. أعد الطرد المركزي وتخلص من السائل الطافي واحتفظ بالراسب.

٣- ضع الراسب في بيكر صغير واتركه يجف في الهواء لحين تكوين مسحوق ناعم. وإن هذا المسحوق هو مزيج من RNA والبروتينات. انقل المسحوق إلى أنبوبة اختبار محتوية على ١٠ مل تقريباً من كلوريد الصوديوم (١٠٪).

٤- ضع غطاء على أنبوبة الاختبار وضع الأنبوبة في حمام مائي مغلي لمدة ٤٠ دقيقة. وعند نقصان حجم السائل في أنبوبة الاختبار نتيجة للتبخر بسبب التسخين أضف ماء مقطر لإعادة الحجم إلى ١٠ مل.

٥- برّد محتويات أنبوبة الاختبار إلى درجة حرارة المختبر ثم اعمل طرد مركزي بسرعة 2000×G لمدة ١٠ دقائق. اجمع السائل الطافي الذي يحتوي على RNA الذائب وتخلص من الراسب الذي يحتوي على البروتينات.

٦- أضف حجمين من الكحول الإثيلي المطلق absolute إلى السائل الطافي وضع الأنبوبة في حمام ثلجي لمدة ٥ دقائق. اجمع الراسب المحتوي على RNA من خلال إجراء طرد مركزي بسرعة G× 3000 لمدة ١٠ دقائق. تخلص من السائل الطافي. اغسل الراسب بإضافة الأسيتون وحرّكه لبضع دقائق. اعمل طرد مركزي بسرعة G× 2000 لمدة ١٠ دقائق وتخلص من السائل الطافي.

٧- ضع الراسب في بيكر واتركه يجف في الهواء للحصول على المستحضر النهائي لـ RNA. ويمكن تجميد هذه المادة لاستعمالها فيما بعد.

٤- الكشف عن RNA باستعمال تفاعل الأورسينول

١- حضر حامل أنابيب اختبار يحتوي على ستة أنابيب اختبار مرقمة من ١- ٦. وسوف تستعمل الأنابيب ١- ٤ لأعداد منحنى تركيز RNA القياس، أما الأنبوبة رقم ٥ فستستعمل بوصفها السيطرة blank control، بينما تحتوي الأنبوبة ٦ على محلول RNA المستخلص ذو التركيز المجهول.

٢- ذوّب ١ ملغم من RNA الخميرة التجاري في ٦ مل من الماء المقطر. ويمكن تسهيل ذوبان RNA بإضافة عدة قطرات من ١, ٠ عياري (0.1N) من حامض الهيدروكلوريك. وهذا سيمثل محلول RNA القياسي المحتوي على ١٦٦, ٠ ملغم من RNA/ مل.

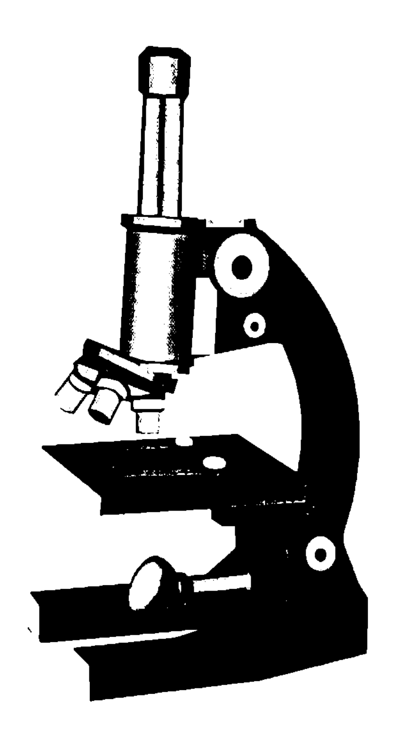
٣- ضع ٣ مل من الماء المقطر في الأنابيب ٢ و ٣و ٤و ٥. ثم ضع ٣ مل من محلول RNA القياسي في الأنابيب ١و ٢. امزج محتويات الأنبوبة ٢ ثم ضع ٣ مل من هذا المحلول في الأنبوبة ٣ وامزج المحتويات ثم انقل ٣ مل إلى الأنبوبة ٤ وامزج المحتويات وتخلص من ٣ مل من محلول الأنبوبة ٤. أضف إلى الأنبوبة (٦) ٣ مل من مستحضر RNA المستخلص.

٤- ضع ٦ مل من كاشف الأورسينول الحامضي acid- Orcinol reagent و ٤, ٠ مل من كاشف الأورسينول الكحولي في كل أنبوبة من أنابيب الاختبار الستة. ضع جميع الأنابيب في حمام مائي مغلي لمدة ٢٠ دقيقة ثم برّد الأنابيب بغمرها في حمام ثلجي.

٥- عيّن الامتصاصية absorbance لكل أنبوبة عند طول موجي ٦٦٠ نانومتر متبعاً الطريقة المستعملة في قياسات DNA. سجل هذه المعلومات في الجدول – ٧. ارسم منحنى RNA القياسي وعيّن من خلال هذا المنحنى تركيز RNA في المستخلص الطحال.

الجدول- ٧: مخطط يوضح التقدير الكمي لـ RNA

الأنبوبة	المحتويات والتركيز	النفاذية ٪	الامتصاصية
١	RNA (١٦٦, ٠ ملغم/ مل)		
٢	RNA (٠٨٣, ٠ ملغم/ مل)		
٣	RNA (٠٤٢, ٠ ملغم/ مل)		
٤	RNA (٠٢١, ٠ ملغم/ مل)		
٥	ماء مقطر (صفر، السيطرة)		
٦	مستحضر RNA المجهول		



المختبر الثاني

المجهـــر الضوئي

Light Microscopy

يمكن للمجهر الضوئي أن يوسع من قابليتنا في رؤية التفاصيل مكبرة ١٠٠٠ مرة، لذا يمكننا رؤية الأجسام التي يتراوح قطرها ٠,١ مايكرومتر (um) أو ١٠٠ نانومتر (nm). أما المجهر الإلكتروني النفاذ transmission electron microscope فقد وسّع هذه القابلية بحيث يمكن رؤية الأجسام التي يتراوح قطرها ٠,٥ نانومتر. وبدون المجهر ستكون معلوماتنا عن تراكيب الخلايا والأنسجة ووظائفها محدودة جداً.

تدعى القابلية على تمييز التفاصيل بقدرة التبيّن resolving power والتي تعتمد على طول موجة الضوء المستعملة والفتحة العددية numerical aperture (صفة من صفات المجهر التي تحدد كمية الضوء الداخلة إلى العدسة). ويمكن التعبير عن قدرة التبيّن باستعمال الصيغة الآتية:

$$\text{قدرة التبيّن} = \frac{\text{طول موجة الضوء المستعملة}}{\text{٢} \times \text{الفتحة العددية}}$$

وفي حالات الرؤية الطبيعية تزداد قدرة التبيّن بانخفاض طول موجة المصدر الضوئي. يعد المجهر الأداة الرئيسة لعالم الأحياء. فبدون المجهر لم تكن نظرية الخلية cell theory قد تطورت ولكان هناك نقصاً في معظم معلوماتنا الحالية عن الأشياء الصغيرة التي لا يمكن رؤيتها بالعين المجردة. لذا سيتركز هذا المختبر حول كيفية استعمال المجهر والعناية به.

أجزاء المجهر المركب Parts of a Compound Microscope:

بالاستعانة بالشكل-٧ حدد مواقع أجزاء المجهر المتوفر في مختبرك.

١- العدسة العينية Ocular Lens

وهي العدسة التي يُنظر من خلالها. فإذا كانت هناك عدسة عينية واحدة فإن المجهر الذي تستعمله هو مجهر أحادي العدسة العينية monocular microscope وإذا كانت هناك عدستين عينيتين فالمجهر ثنائي العدسة العينية binocular microscope

ويمكن تكييف العدسات العينية للمجهر ثنائي العدسة لكي تتلائم مع المسافة بين العينين لمختلف الأفراد وهذا ما يدعى بالتعديل بين البؤبؤي interpupillary adjustment وقد تحتوي إحدى العدسات العينية على عقدة knob يمكن تدويرها بحيث تساعد في حركة العدسة نحو الداخل أو الخارج للتعويض عن أي تباين في تركيز الصورة بين العينين. وسوف يقوم المدرس بتوضيح كيفية إجراء هذه التعديلات.

إن العدسات العينية الموجودة في المجاهر المختلفة لها قوى تكبير مختلفة (أي 5X ، 10X). ويمكنك إخراج العدسة العينية من الأنبوب الموجودة فيه لمعرفة قوة تكبيرها magnification. لاحظ قوة تكبير العدسة العينية الموجودة في مجهرك.

٢- العدسة الشيئية Objective Lens

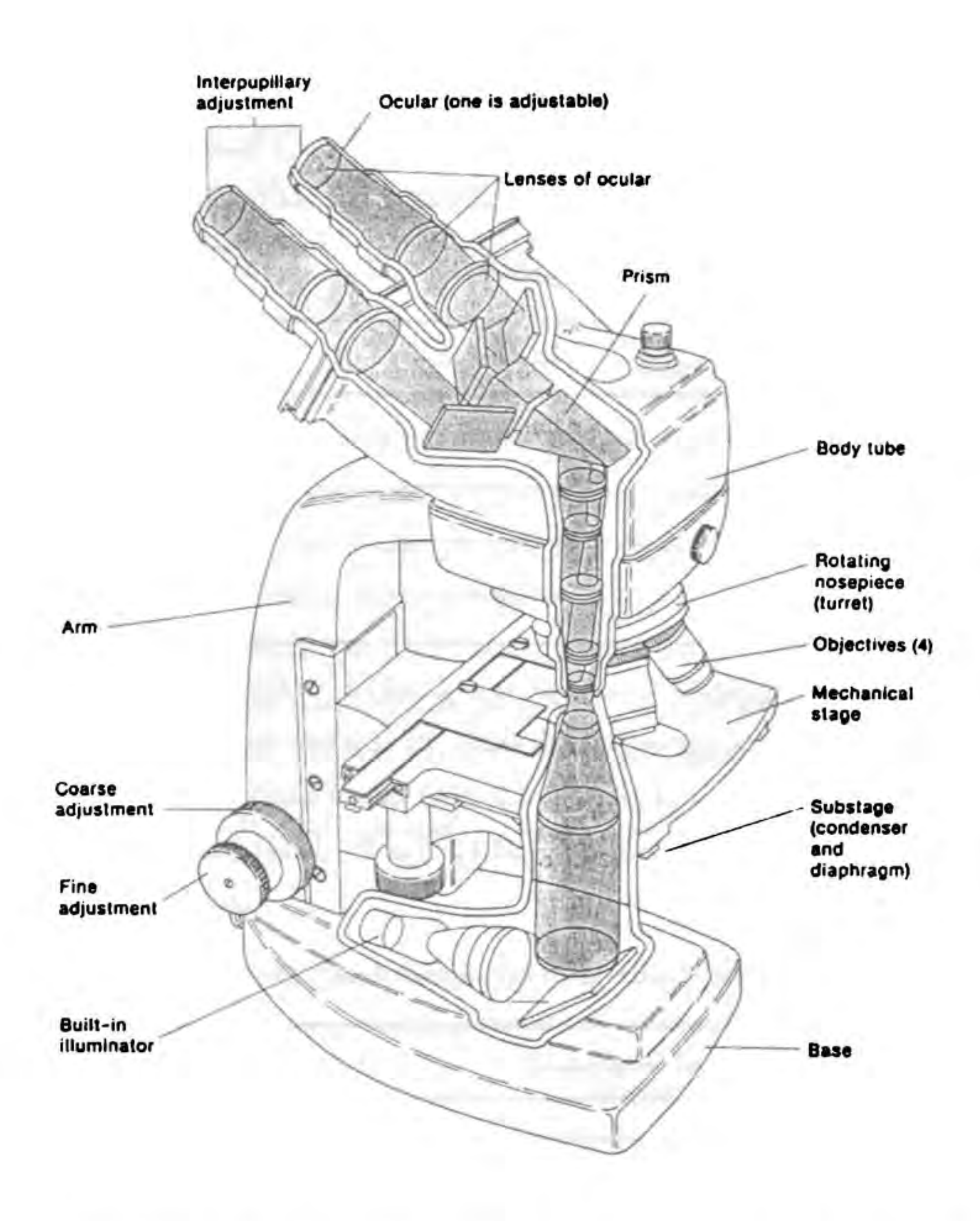
يرتبط بقاعدة الأنبوب البدني body tube للمجهر الجزء الأنفي الدوار (الأنفية الدوارة) rotating nosepiece. ويرتبط بالجزء الأنفي الدوار ثلاث أو أربع عدسات شيئية objectives. وعند تدوير الجزء الأنفي يمكن سماع طقطقة click تمثل استقرار العدسة الشيئية في موضعها. وتقوم العدسات الشيئية بتركيز الضوء المار خلال العينة إلى الأنبوب البدني ثم خلال العدسات العينية. ويلاحظ وجود أرقام مختومة على كل عدسة شيئية، ويمثل أحد هذه الأرقام قوة تكبير العدسة الشيئية (مثلاً 43x). وتسمى العدسات الشيئية عادة تبعاً لقوة تكبيرها وكما يأتي:

القوة المتفرّسة scanning power – (4X)

القوة الصغرى low power –(10X)

القوة الكبرى high power– (43 X)

قوة العدسة الزيتية oil immersion – (93 X)



شكل- ٧: الميكروسكوب المركب binocular microscope مصمم مسار مرور الضوء من مصدره خلال مختلف العدسات والموشور.

ما هي قوى تكبير العدسات الشيئية لمجهرك؟

يمكن حساب القوة الكلية للتكبير total magnification من خلال ضرب قوة تكبير العدسة العينية في قوة تكبير العدسة الشيئية للمجهر قيد الاستعمال. احسب القوة الكلية للتكبير للعدسات العينية والشيئية لمجهرك باستعمال الجدول- ٨.

الجدول- ٨: حساب القوة الكلية للتكبير للعدسات العينية والشيئية

العدسة العينية	X	العدسة الشيئية	=	القوة الكلية للتكبير

أما المجموعة الثانية من الأرقام الموجودة على العدسة الشيئية والتي تكون بشكل كسور عشرية decimal عادة فإنها تمثل الفتحة العددية numerical number للعدسة. ويلاحظ أن مختصر الفتحة العددية (NA) قد يسبق الرقم الموجود على العدسة الشيئية. وباستعمال الجدول- ٩ دوّن قوة تكبير كل عدسة شيئية وفتحتها العددية للمجهر الخاص بك.

الجدول-٩ : الفتحة العددية وقوة التكبير للعدسات الشيئية

قوة تكبير العدسة	الشيئيةالفتحة العددية (NA)

٣- الأنبوب البدني Body Tube

ينتقل الضوء من العدسات الشيئية إلى العينية خلال سلسلة من العدسات المكبّرة في الأنبوب البدني. ويكون الأنبوب البدني في بعض المجاهر مستقيماً. أما في المجاهر الأخرى فتكون العدسات العينية مثبتة بزاوية كما في الشكل – ٧،ويحتوي الأنبوب البدني على موشور prism يعمل على انحناء الأشعة الضوئية بحيث تمر خلال العدسات العينية.

٤- المسرح (المنصّة) Stage:

يدعى السطح الذي توضع عليه الشريحة الزجاجية بالمسرح أو المنصة. لاحظ وجود فتحة في مركز المسرح. ويكون المسرح في بعض المجاهر ثابتاً حيث يحتوي على ماسكات clips لتثبيت الشريحة في موضعها على المسرح. أما في المجاهر الأخرى فإن المسرح يكون متحركاً ويدعى بالمسرح الميكانيكي mechanical stage وتتم السيطرة على حركة المسرح من خلال عقدتين knobs واقعتين على السطح العلوي الجانبي أو السفلي للمسرح. لاحظ وجود مقياسين على المسرح أحدهما أفقي horizontal stage والآخر عمودي vertical stage.

كيف يتم تثبيت الشرائح الزجاجية في موقعها على المسرح الميكانيكي؟

٥- تحت المسرح Substage

تدعى المنطقة الواقعة أسفل المسرح بتحت المسرح والتي قد تحتوي على الحجاب diaphragm أو المكثف condenser أو كلاهما.

أ - الحجاب Diaphragm

يعمل الحجاب على تنظيم كمية الضوء المارة من المصدر الضوئي خلال العينة ومن خلال نظام عدسات المجهر. ومن خلال التحكم بالحجاب يمكن الحصول على تباين أفضل بين الوسط المحيطي surrounding medium والعينة وبذلك تتحسن صورة العينة. وقد يكون هذا الحجاب حلقياً annular أو قزحياً iris

* يتألف الحجاب الحلقي annular diaphragm من صفيحة دائرية تحتوي على ثقوب ذات أقطار مختلفة. ويمكنك تدوير الصفيحة لوضع الثقوب المختلفة في المسار الضوئي وبذلك تنتظم كمية الضوء المارة من المصدر الضوئي خلال العينة.

* يتألف الحجاب القزحي iris diaphragm من حلقة ذات صفائح معدنية رقيقة متراكبة. ويلاحظ وجود عتلة lever جانبية متصلة بالحجاب القزحي تعمل على فتح الصفائح وغلقها وبذلك تنتظم كمية الضوء الداخلة إلى المجهر. ما هي نوعية الحجاب الموجود في مجهرك؟

ب - المكثف Condenser

يحتوي المكثف على سلسلة من العدسات التي تعمل على تركيز الضوء على العينة specimen. ويتحرك المكثف إلى الأعلى والأسفل بواسطة عقدة knob موجودة على جانب المجهر أو بواسطة عتلة lever تخرج من موقع المكثف. ويمكن تحسين درجة وضوح صورة العينة من خلال تنظيم المكثف. ويرتبط بالجزء السفلي من المكثف حامل المرشح filter holder الذي يحتوي في العادة على مرشح أزرق blue filter. لماذا يستعمل المرشح الأخضر أو الأحمر عند تسجيل الملاحظات المجهرية؟

٦- مصدر الضوء Light Source

قد يحتوي المجهر على مرآة متصلة به أو مصدر ضوء داخلي. وعادة ما تكون المرآة مقعرة concave من جانب واحد ومستوية (مسطحة) flat من الجانب الآخر. ويستعمل الجانب المستوي (المسطح) للمرآة في حالة العدسة الشيئية المتفرّسة والعدسة الشيئية ذات القوة الصغرى. أما المرآة المقعرة فإنها تستعمل في حالة العدسة الشيئية ذات القوة الكبرى. وعادة ما يستعمل مصباح lamp بوصفه مصدراً ضوئياً لهذه المرآة. كما ويستعمل الضوء الطبيعي إلا أنه لا يفضل استعماله بسبب تغير شدته الضوئية.

يقع المصدر الضوئي لمعظم المجاهر في قاعدة المجهر حيث تتم السيطرة عليه

بواسطة مفتاح التشغيل on/ off switch. ويمكنك السيطرة على كمية الضوء الداخلة إلى العينة من خلال التحكم بالحجاب. كما ويمكن السيطرة على شدة الضوء من خلال التحكم بفولتية المحوّلة transformer المرتبطة بالمصدر الضوئي. استعمل فولتية واطئة أو متوسطة لمعظم الملاحظات المجهرية. وسوف تحتاج إلى فولتية عالية عند استعمال العدسة الزيتية. لماذا؟

٧- تركيز الضوء Focusing

يمكن تنظيم تركيز الضوء في المجهر من خلال استعمال عقدة المنظم الكبير coarse adjustment knob أو الدقيق fine adjustment konb والتي تعمل على رفع أو خفض الأنبوب البدني أو المسرح، وهذا يعتمد على نوع المجهر المستعمل. فعندما تكون العدسة الشيئية للقوة الصغرى في موقعها مسافة ¼ أنج فوق المسرح اعمل على تدوير عقدة المنظم الكبير نصف دورة باتجاه عقرب الساعة clockwise في الوقت الذي تراقب فيه حركة العدسة الشيئية للقوة الصغرى. اعمل الشيء نفسه باستعمال عقدة المنظم الدقيق. واستناداً لهذه الملاحظات لماذا لا يمكن استخدام عقدة المنظم الكبير لتركيز الضوء عندما تكون العدسة الشيئية للقوة الكبرى أو الزيتية في موقعها؟

٨- نظارات العين واستعمال المجهر Eyeglasses and Microscope Usage:

إذا كنت مصاباً بقصر البصر أو بعد البصر فلا تحتاج للبس النظارات عند استعمالك للمجهر. إذ يمكن التعريض عن ذلك بإجراء التعديلات المناسبة في تركيز الضوء. ويمكنك لبس النظارات في حالة الأستكماتزم astigmatism (خلل في السطح العاكس للعين)، إذ أنه في هذه الحالة لا يمكن تصحيح الحالة باستعمال عدسات المجهر. وعلى كل حالة يمكن إبقاء العينين مفتوحتين في حالة استعمال المجهر أحادي العدسة العينية لكي لا تتعب العين الأخرى.

ب - الاستعمال المناسب للمجاهر Proper Use of Microscopes:

يجب تنظيف العدسات العينية والشيئية بورق العدسات lens paper قبل استعمال المجهر. استعمل الحركة الدورانية في التنظيف لتجنب خدش العدسات.

وعند استعمال المجهر تجنب تماس العدسة العينية بأهداب العين eyelashes إذ أن الزيت الموجود في الأهداب يلتصق بالعدسة العينية ويلطخها. وعند استعمال محاليل ملحية أو مواد كيمياوية مخرشة لتحضير العينات يجب بعدها تنظيف العدسات العينية والشيئية والشرائح المجهرية لتجنب تلف المجهر. ويعد المجهر من الأجهزة الحساسة والدقيقة لذا يجب التعامل معه بكل عناية. وفيما يأتي بعض التوجيهات الضرورية الواجب اتباعها لتجنب الحوادث التي قد تؤدي إلى تلف المجهر:

❋ تجنب إسقاط المجهر أو وضعه في مكانه على المنضدة بقوة أو إسقاط عدساته العينية.

أ- احمل المجهر بوضع عمودي وباستعمال كلتا اليدين.

ب- ابعد المجهر عن حافة المنضدة في حالة عدم استعماله.

جـ- ابعد السلك الكهربائي للمجهر عن الطريق لكي لا تعثر به مما يسبب سقوط المجهر أو المحوّلة على الأرض.

❋ تجنب كسر غطاء الشريحة coverslip أو الشريحة الزجاجية أو كلاهما عند إجراء عملية تركيز الضوء focusing.

أ- حدد موقع العينة أولاً باستعمال القوة الصغرى للعدسة الشيئية بعدها تحول إلى القوة الكبرى للعدسة الشيئية.

ب- لا تستعمل عقدة المنظم الكبير في حالة القوة الكبرى للعدسة الشيئية ولا تستعمل القوة الكبرى عند فحص العينات السميكة أو العينات بأكملها.

❋ تجنب المشكلات الميكانيكية في أجزاء المجهر المختلفة.

أ- لا تجبر أجزاء المجهر على العمل.

ب- عند تبديل المصباح الضوئي لا تضغط عليه بقوة لأنه قد ينكسر بين أصابعك.

جـ- لا تحاول تفكيك dismantle أجزاء المجهر.

جـ - استعمال المجهر المركب Using a Compound Microscope

١ - تركيز الضوء Focusing

١- نظف العدسات العينية والشيئية باستعمال ورق العدسات.

٢- اقطع الحرف e من مجلة أو جريدة. نظف الشريحة الزجاجية وثبت الحرف e باستعمال الطريقة المذكورة في الشكل ٨. ضع عدسة القوة المتفرسة (4X) أو القوة الصغرى (10X) في موضعها المخصص، بعدها ضع الشريحة على المسرح.

٣- افتح مصدر الإضاءة ثم افتح الحجاب بأكمله. وفي حالة وجود مكثف ضعه على أقصى ارتفاع بحيث تكون العدسة العليا للمكثف قريبة من المسرح.

٤- ضع العينة في مركز فتحة المسرح.

٥- اجعل العدسة الشيئية تقترب من الشريحة دون أن تمسها. وفي أثناء النظر من خلال العدسة العينية استعمل عقدة المنظم الكبير إلى الحد الذي تتوضح فيه العينة.

٦- استعمال الحجاب diaphragm أو غيّر في فولتية المحوّلة لإعادة تنظيم شدة الضوء إذا كانت الحاجة تستدعي لذلك، بعدها ضع العينة في المركز من خلال تحريك الشريحة.

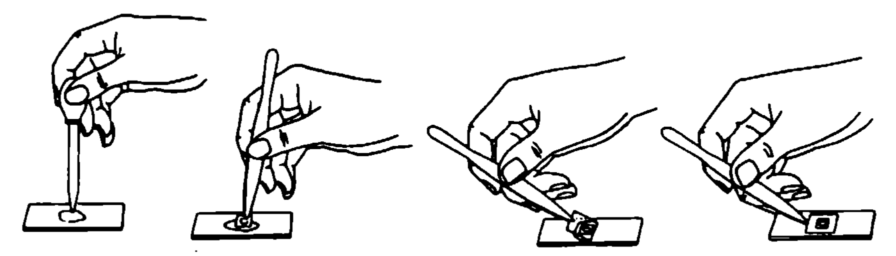
٧- إذا كنت تستعمل العدسة الشيئية المتفرّسة (4X) فيمكنك تحويلها إلى عدسة القوة الصغرى (10X). وتأكد من استقرار عدسة القوة الصغرى في موقعها من خلال سماع صوت الطقطقة click. ويمكنك تركيز الإضاءة من خلال حركة بسيطة في عقدة المنظم الدقيق.

<u>تحذير</u>: عند ظهور صورة حرف e بشكل واضح بعد تغيير العدسة الشيئية يمكنك في هذه الحالة استعمال عقدة المنظم الكبير ثم المنظم الدقيق لإعادة توضيح الصورة.

ولابد من الإشارة إلى عدم إجراء مثل هذا التغيير عند استعمال عدسة القوة الكبرى أو الزيتية. وفي حالة وجود صعوبة في ذلك يمكنك الاستعانة بالمدرس.

أعد العينة إلى وسط الحقل المجهري واعمل على تنظيم الحجاب وموقع المكثف لزيادة التباين contrast في العينة.

٨- حوّل العدسة الشيئية إلى القوة الكبرى (43X) وحاول تنظيم صورة العينة باستعمال عقدة المنظم الدقيق.



شكل – ٨: تحضير شرائح wet mount

تستعمل هذه الطرق في العادة عند فحص العينات الرطبة أو الشرائح المحضرة تجارياً. ويجب عليك أن تستعمل الشرائح النظيفة دائماً وأن تنقل من عدسة القوة الصغرى إلى عدسة القوة الكبرى مع بعض التركيز القليل للضوء في حالة الضرورة وتعلم الضبط الدقيق لمجهرك.

٢ - الصورة المجهرية The Microscopic Image:

تتأثر الصورة المتكونة في المجهر بعدة عوامل تتمثل باتجاه الصورة orientation وقوة التكبير الكلية total magnification ودرجة وضوح الحقل المجهري ومستوى تركيز الضوء وعمقه وتباين العينة.

أ - اتجاه الصورة Orientation of the Image

امسك الشريحة الزجاجية المحتوية على الحرف e بوضعها الصحيح. ضع هذه الشريحة على مسرح المجهر في موقعها المحدد ثم افحص هذه الشريحة باستعمال عدسة

القوة الصغرى. ما هو الاختلاف الذي تلاحظه من حيث اتجاه الصورة عند النظر إليها من خلال العدسة العينية بالمقارنة مع النظر إليها مباشرة باستعمال العينين. في الوقت الذي تنظر فيه إلى الصورة من خلال المجهر حاول تحريك الصورة نحو اليمين ولاحظ في أي اتجاه تتحرك الصورة.

حاول تحريك الصورة إلى الأعلى بعيداً عنك ولاحظ اتجاه حركة الصورة. في أي اتجاه يتم تحريك الصورة لكي تتحرك هذه الصورة نحو اليمين أو الأعلى.

عندما تريد الإشارة إلى شيء مهم في العينة يمكنك في هذه الحالة وصف الموقع التقريبي للشيء المهم من خلال اعتبار الحقل المجهري على أنه ساعة clock. وفي هذه الحالة يمكن إخبار الشخص بالرؤية على الساعة الثالثة أو انظر إلى المركز باتجاه الساعة التاسعة وهكذا. وتحتوي بعض المجاهر على خط أسود نحيف يظهر في العدسة العينية والذي يدعى بالمؤشر pointer. وفي هذه الحالة يمكنك تحريك الشيء المراد ملاحظته ووضعه في نهاية المؤشر.

ب - وضوح الحقل المجهري والمسافة العاملة

افحص العينة الموجودة على الشريحة باستعمال القوة الصغرى للعدسة الشيئية أولاً ثم العدسة الشيئية للقوة الكبرى ثانياً. أعطِ وصفاً للتغيرات الحاصلة في درجة وضوح الحقل المجهري عند تغيير العدسة الشيئية.

تدعى المسافة بين الشريحة والعدسة الشيئية بالمسافة العاملة working distance وتقل هذه المسافة بزيادة قوة تكبير العدسة الشيئية.

جـ - عمق تركيز الصورة Depth of Focus

كما هو الحال في العين البشرية فإن عدسات المجهر توفر حدوداً لعمق تركيز الصورة أو تعديلها لرؤيتها بوضوح. وهذا يعني بأن جزءً من الجسم المراد رؤيته هو الذي يمكن رؤيته بشكل واضح وحاد أما بقية الأجزاء الواقعة أعلى الجسم أو أسفله فإنها لا يمكن رؤيتها بدرجة الوضوح نفسها أو تكون خارج البؤرة. ولغرض رؤية الشكل الثلاثي الأبعاد three- dimensional form ومفهوم عمق تركيز الصورة خذ

خيطين متقاطعين أبيض وأحمر وضعهما على شريحة زجاجية ثم أضف إليهما قطرة ماء وضع غطاء الشريحة. وباستعمال العدسة الشيئية المتفرّسة (4X) حاول التركيز على منطقة تقاطع الخيطين وحدد عمق تركيز الصورة عند قوة التكبير هذه. فعلى سبيل المثال هل أن صورة كلا الخيطين بدرجة الوضوح نفسها أو أن الصورة واضحة عند منطقة التقاطع فقط؟. غيّر العدسة الشيئية إلى القوة الكبرى (43X) ولاحظ التغيرات الحاصلة في عمق تركيز الصورة.

يصعب تحديد الشكل الثلاثي الأبعاد في حالة التكبير العالي إلا أنه ليس مستحيلاً. ويمكنك القيام بذلك من خلال تكوين مقاطع بصرية optical sections في ذاكرتك عند محاولتك التركيز على العينة specimen (شكل – ٩). حاول تحديد التركيب الثلاثي الأبعاد للتحضير الخاص بك باستعمال القوة الكبرى من خلال سلسلة من المقاطع البصرية وكما موضحة في الشكل –٩. حيث تبدأ بالتركيز على سطح قمة الخيط ثم تستمر باتجاه السطح السفلي للخيط.

د - التباين Contrast

يمكن رؤية جسم ما تحت المجهر في حالة وجود تباين كافٍ بين الجسم والوسط المحيط به أو بين الجزاء المختلفة للجسم. ويمكنك تحسين تباين الصورة من خلال تنظيم فتحة الحجاب diaphragm. وهذا سيؤدي إلى انحراف الأشعة الضوئية من حافة الحجاب ودخولها إلى العينة بزاوية. وإن مثل هذا التشتت للأشعة سيجعل النسيج يبدو وكأنه معتماً. فضلاً عن ذلك فإن الخلايا والتراكيب الخلوية قد تحتوي على صبغات طبيعية (مثل الكلوروفيل في البلاستيدات الخضراء والهيموكلوبين في خلايا الدم الحمر) والتي تعطي التباين الذي يجعل هذه التراكيب مرئية visible. ومن ناحية أخرى فإن العديد من الخلايا والأجزاء الخلوية تكون شبه شفافة translucent. وإن إحدى الطرق المستعملة في تحسين التباين في مثل هذه الخلايا هي استعمال الصبغات stains التي ترتبط أو تؤخذ من قبل التراكيب الخلوية المختلفة والتي تمتص بدورها الكمية الكافية من الضوء لإعطاء التباين.

افحص الخلايا الطلائية epithelial cells لبطانة الخد الداخلية باتباع التعليمات الموجودة في الشكل – ١٠.

تحذير: لا تعطِ عود الأسنان toothpick لطالب آخر وتخلص من هذا العود بعد أخذ العينة من الخلايا الظهارية وإعداد الشريحة.

حاول في البداية تحديد بعض تراكيب الخلايا الطلائية من خلال تعديل الحجاب والمكثف. أضف قطرة من صبغة المثيلين الزرقاء methylene blue إلى حافة غطاء الشريحة واسحبها كما في الشكل – ١٠. حدد التغيرات الحاصلة في تباين التراكيب الخلوية أو في رؤيتها.

هـ - قياس العينات المجهرية Measurement of Microscopic Specimens:

إذا كنت تعرف قطر الحقل المجهري عند كل قوة تكبير فعندئذ يمكنك تقدير حجم العينة المراد فحصها. ولغرض تحديد قطر الحقل المجهري ضع مسطرة مليمترية شفافة millimeter rule على مسرح المجهر وركز على المسطرة ثم حاول قياس قطر الحقل باستعمال العدسة الشيئية للقوة المتفرّسة والقوة الصغرى. وهناك صعوبة في قياس الحقول المجهرية للقوة الكبرى والزيتية، إلا أنه يمكن الحصول على قيم تقريبية من خلال الصيغة الآتية:

$$\frac{D_H}{D_L} = \frac{X_L}{X_H} \quad \text{or} \quad D_H = \frac{D_L \times X_L}{X_H}$$

حيث أن:

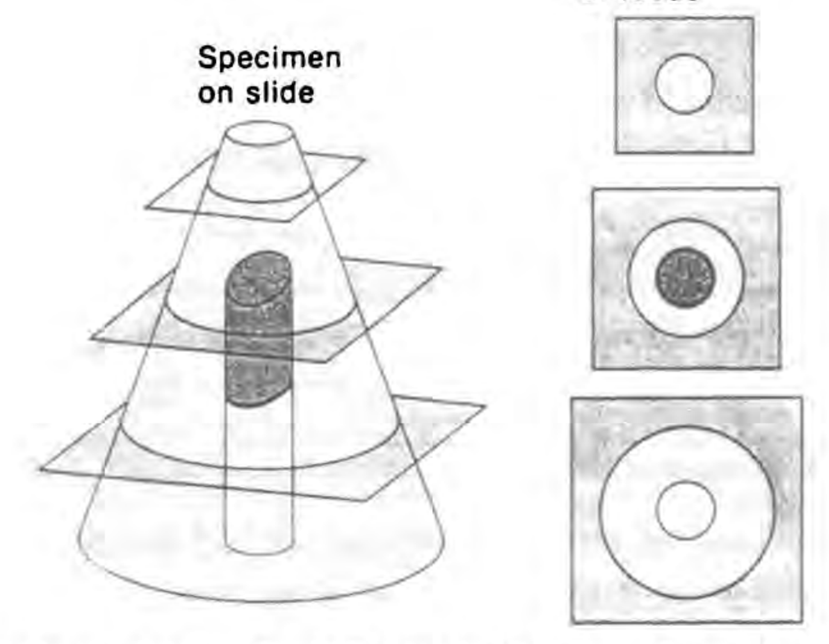
D_L تمثل القطر في الحقل المجهري للقوة الصغرى

D_H تمثل القطر في الحقل المجهري للقوة الكبرى

x_L تمثل قوة تكبير العدسة الشيئية للقوة الصغرى.

X_H تمثل قوة تكبير العدسة الشيئية للقوة الكبرى.

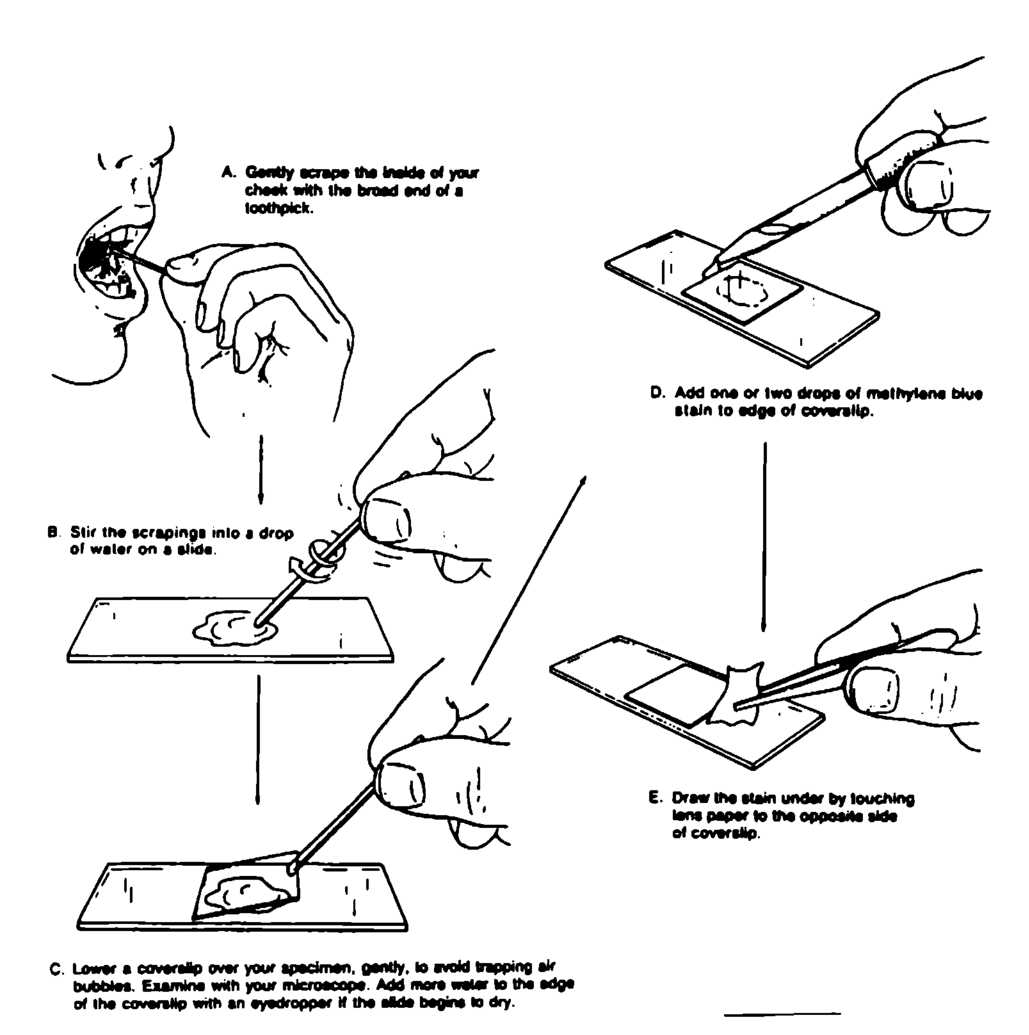
استعمل القيم المناسبة في الصيغة السابقة ثم احسب الأقطار التقريبية للحقول المجهرية الشيئية للقوة الكبرى والزيتية للمجهر العائد لك.



شكل – ٩: تعيين الصور ثلاثية الأبعاد خلال التقطيع البصري optical sectioning

وهناك طريقة أخرى للقياس أكثر دقة تتضمن استعمال المقياس العيني الدقيق (المايكرومتر العيني) ocular micrometer والذي هو عبارة عن قرص زجاجي صغير يحتوي على خطوط مقسمة بمسافات متساوية غير معروفة القيمة (الشكل – ١١). يوضع المايكرومتر العيني داخل العدسة العينية للمجهر حيث تتم معايرتها باستعمال مقياس المسرح الدقيق (مايكرومتر المسرح) stage micrometer والذي يحتوي على خطوط ذات مسافات متساوية معروفة القيمة (الشكل – ١١). ويوضح الشكل-١١ مايكرومتر المسرح والمايكرومتر العيني. ولغرض معايرة المايكرومتر العيني تعتمد الطريقة الآتية:

١- دوّر العدسة العينية داخل الأنبوب البدني إلى أن تصبح خطوط المايكرومتر العيني موازية لخطوط مايكرومتر المسرح. حاول مطابقة الخطوط عند الحافة اليسرى للمايكرومتر العيني ومايكرومتر المسرح من خلال تحريك مايكرومتر المسرح.



شكل- ١٠: تحضير شرائح wet mount وصبغ الخلايا وذلك من أجل زيادة contrast الصورة عند دراسة الشريحة تحت المجهر

٢- احسب المسافة الحقيقية (بالمليمترات) بين خطوط المايكرومتر العيني من خلال ملاحظة عدد المسافات الموجودة في مايكرومتر المسرح والواقعة ضمن عدد معين من مسافات المايكرومتر العيني. ونظراً لكون أصغر مسافة على مايكرومتر المسرح تساوي ٠,٠١ ملم لذا يمكنك معايرة المايكرومتر العيني كالآتي:

أ- إن عشرة مسافات على المايكرومتر العيني تساوي المسافات (X) على مايكرومتر المسرح.

ب- بما أن أصغر مسافة مايكرومتر المسرح تساوي ٠,٠١ ملم لذا فإن عشرة مسافات على المايكرومتر العيني = المسافات (X) على مايكرومتر المسرح X ٠,٠١ ملم.

جـ- لذا فإن:

$$\text{مسافة واحدة على المايكرومتر العيني} = \frac{\text{المسافات (X) على مايكرومتر المسرح} \times ٠,٠١ \text{ ملم}}{١٠}$$

د - وبما أن المليمتر الواحد = ١٠٠٠ مايكرومتر

$$\text{مسافة واحدة على المايكرومتر العيني} = \frac{(X) \times ١٠ \text{ مايكرومتر}}{١٠}$$

هـ ـ مثال: إذا كانت عشرة مسافات على المايكرومتر العيني تساوي ستة مسافات على مايكرومتر المسرح، لذا:

$$\text{مسافة واحدة على المايكرومتر العيني (بالملم)} = \frac{٦\times ٠,٠٠١ \text{ ملم}}{١}$$

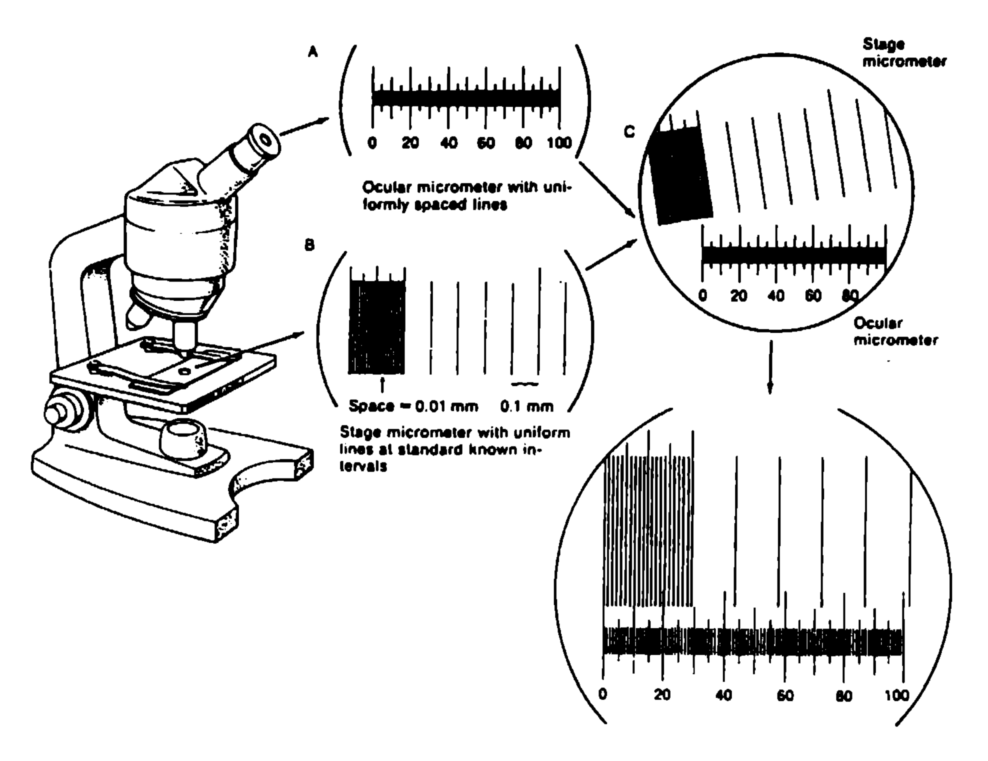
$$= ٠,٠٠٦ \text{ ملم}$$

أو:

$$\text{مسافة واحدة على المايكرومتر العيني (بالملم)} = \frac{٦\times ١ \text{ مايكرومتر}}{١}$$

$$= ٦ \text{ مايكرومتر}$$

ملاحظة: إن الأرقام التي يتم الحصول عليها تمثل العدسة العينية والشيئية المستعملة في المجهر. وتتغير العدسة العينية أو الشيئية في كل فترة لذا يجب معايرة المايكرومتر العيني.



شكل- ١١: استعمال المقياس الدقيق micrometer في العدسة العينية ocular lens والعدسة الشيئية objective lens وذلك من أجل تعيين أبعاد التراكيب الدقيقة في الشرائح البايولوجية المدروسة.

د - استعمال المجهر التشريحي

يوضح الشكل – ١٢ المجهر الستيريوسكوبي والذي يتميز عن المجهر المركب بميزتين هما:

١- يمكن من خلاله فحص الأشياء كبيرة الحجم أو سميكة والتي يتعذر فحصها بالمجهر المركب باستعمال التكبير العالي.

٢- يعطي صورة للعينة ثلاثية الأبعاد.

إن المصدر الضوئي في هذا المجهر قد ينعكس من مصباح وقع فوق العينة أو من خلال نفاذ الضوء في العينة نتيجة لانعكاسه في مرآة واقعة تحت المسرح. ويعتمد اختيار المصدر الضوئي على طبيعة العينة. إذ يستعمل الضوء المنعكس في حالة

الأجسام المعتمة opaque objects أما الضوء النفاذ transmitted light فيستعمل في حالة الأجسام الشفافة transparent objects.

افحص باستعمال المجهر التشريحي أصبعك أو أي شيء آخر معتم.

ثبت العدستين العينيتين بحيث تتناسب مع فتحتي البؤبؤين ثم نظم تركيز الصورة كما في حالة المجهر المركب.

غيّر قوة التكبير من خلال استعمال عقدة التكبير الموجودة في أعلى الأنبوب البدني.

وفي بعض أنواع المجاهر المجسمة يتم تغيير قوة التكبير من خلال العدسات الشيئية كما هو الحال في المجهر المركب.

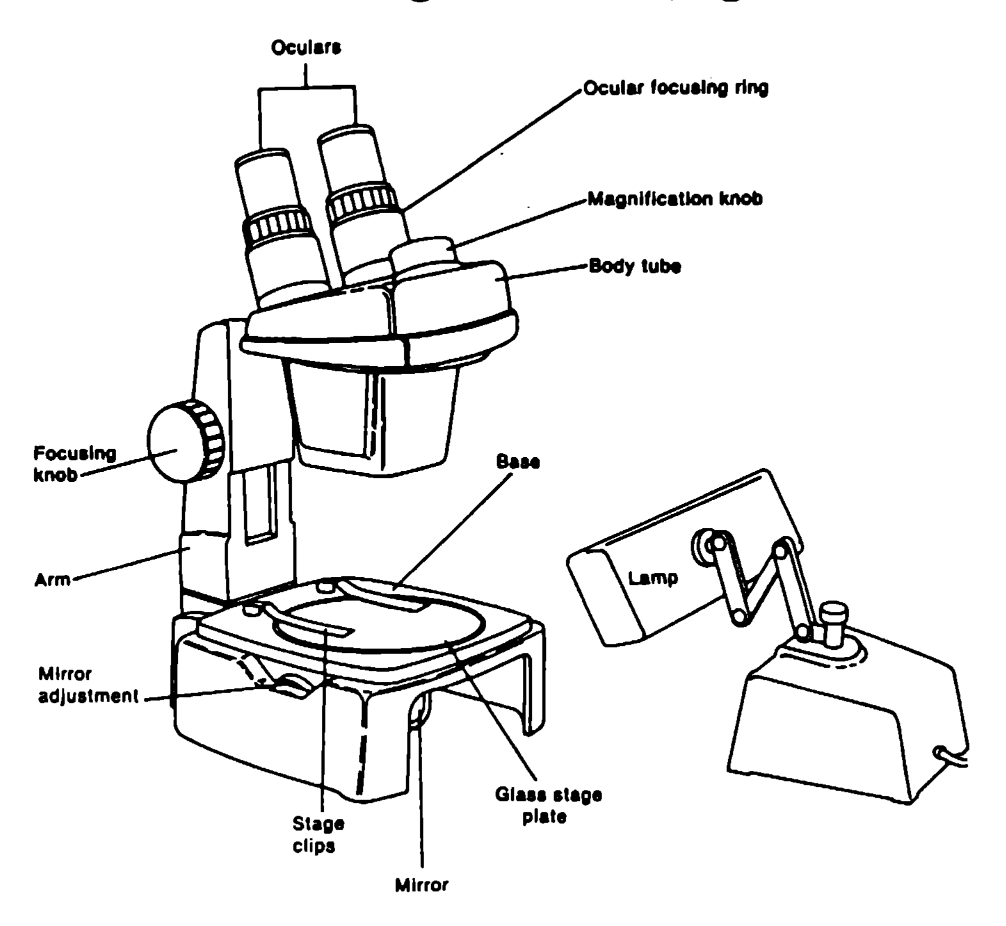
كيف تكون حركة الصورة، قارن مع ما يحدث في المجهر المركب؟ كيف يمكنك تنظيم درجة وضوح الحقل المجهري؟

افحص الشريحة الزجاجية المحضرة سابقاً والمحتوية على الخيطين المتقاطعين. استعمل أولاً الضوء المنعكس من المرآة ثم استعمل الضوء النفاذ. وما هي أهمية استعمال ضوء معين على الضوء الآخر.

هـ - فحص ماء البركة Examination of Pond Water:

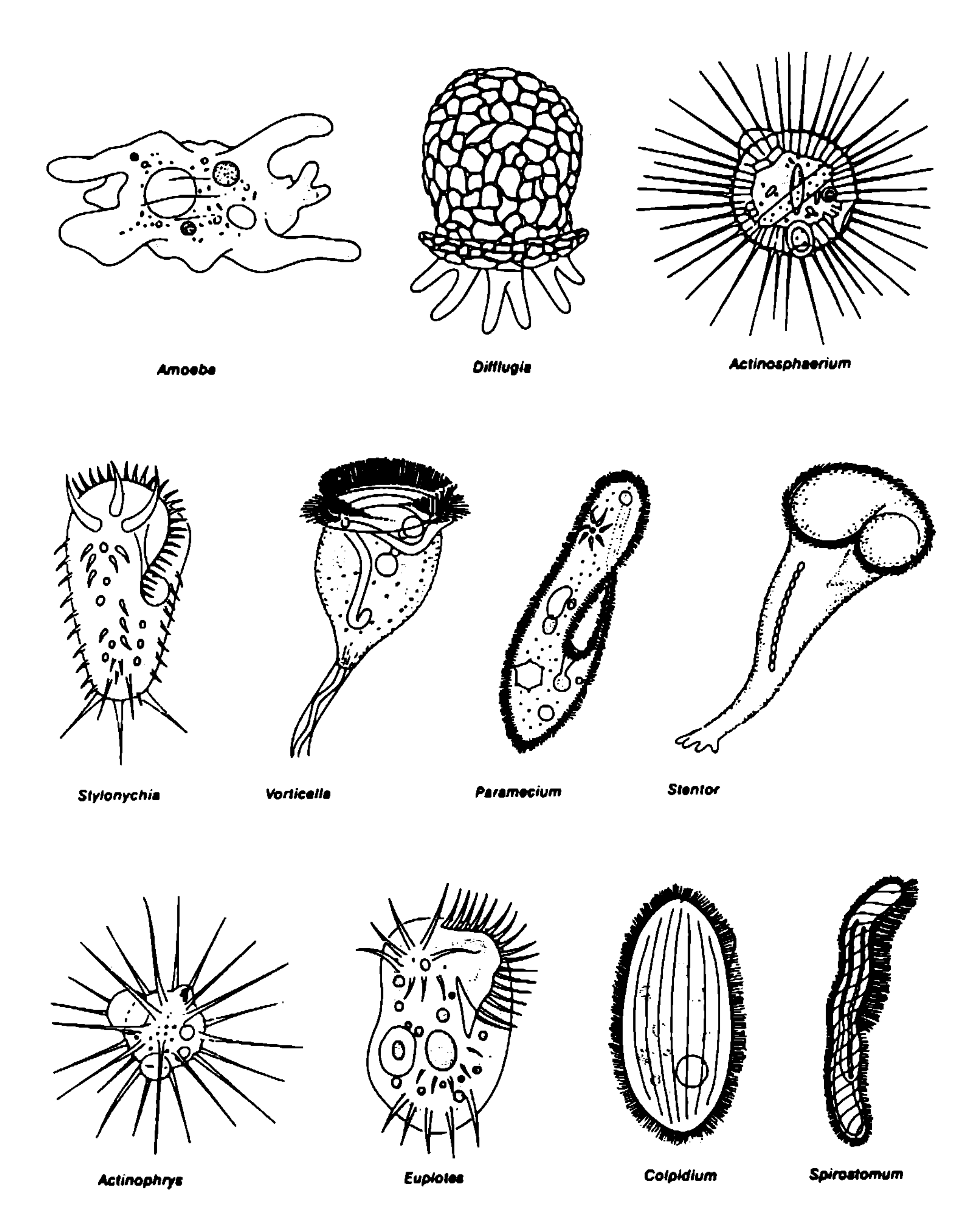
في أثناء عملك داخل المختبر باستعمال المجهر المركب فإن العديد من الملاحظات التي ستحصل عليها ستكون على الكائنات الحية أو الأنسجة أو أجزاء من الكائن الحي الذي تريد الاحتفاظ به حياً. ولغرض ملاحظة المواد الحية حضر عينة من قطرة ماء بركة. ويمكن التخلص من الماء الزائد تحت غطاء الشريحة باستعمال قطعة صغيرة من الورق ووضعها عند حافة غطاء الشريحة. وإذا حدث جفاف في التحضير في أثناء الفحص فيمكن إضافة قطرة من الماء عند حافة غطاء الشريحة. وباستعمال القوة الصغرى والإضاءة القليلة يمكن إجراء مسح لقطرة بركة الماء. وحاول تشخيص العديد من الكائنات التي تعرفها. وأن الأشكال ١٣- ١٦ سوف تساعدك في تشخيص ما تشاهده. أدرس بدقة الاختلافات الموجودة في تركيب الكائنات الحية

وطرق حركتها. حضر عينات رطبة أخرى مأخوذة من اجزاء مختلفة من الوعـاء. ولا تتعجل في التخلص من الشريحة بسبب عدم وجود كائنـات حيـة لأنـه في مثـل هـذه الحالة يجب إجراء مسح عام للشريحة لتحديد مواقع الكائنات الحية.

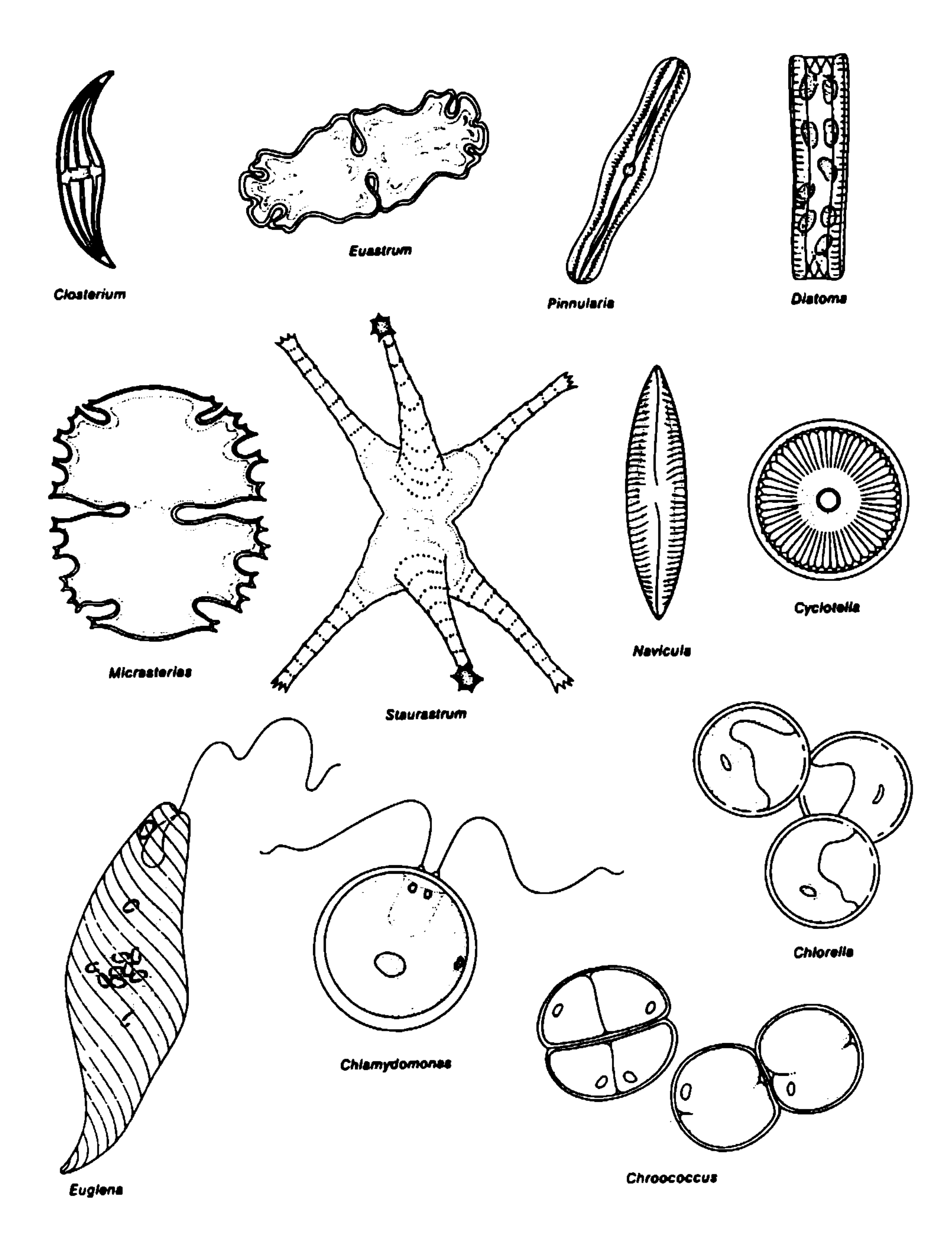


شكل- ١٢: يوضح أجزاء الجهر التشريحي المجسم stereoscopic microscope

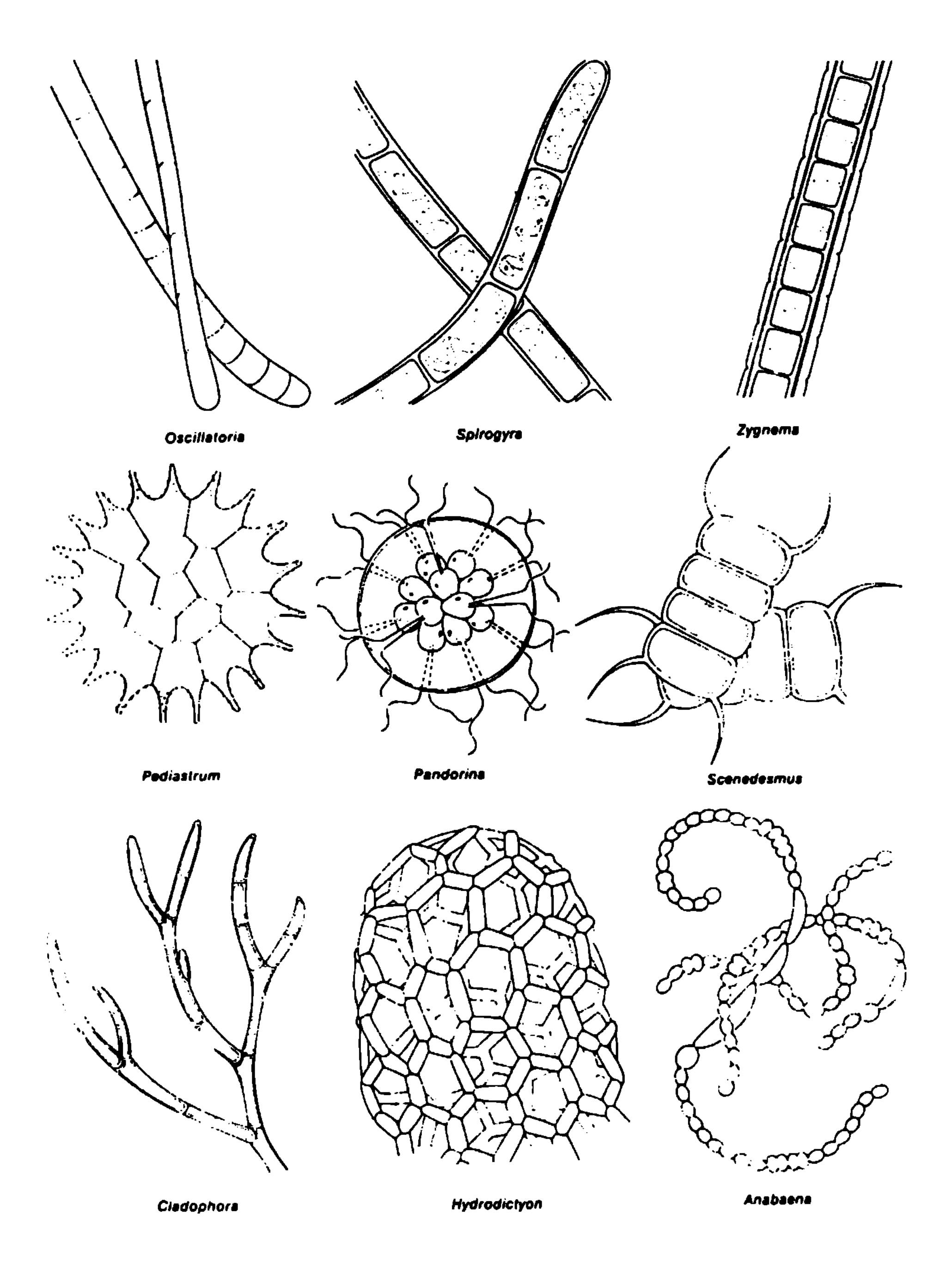
لماذا تتجمع الكائنات الحية الصغيرة عنـد حافـة الشـريحة؟ ولغـرض تشـخيص الكائنات لابد من استعمال العدسـة الشـيئية ذات القـوة الكـبرى. اسـتعمل الطـرق القياسية (قطر الحقل المجهري أو المايكرومتر العيني) وحـدد أطـوال الكائنـات الحيـة المختلفة وعرضها في عينة ماء البركة.



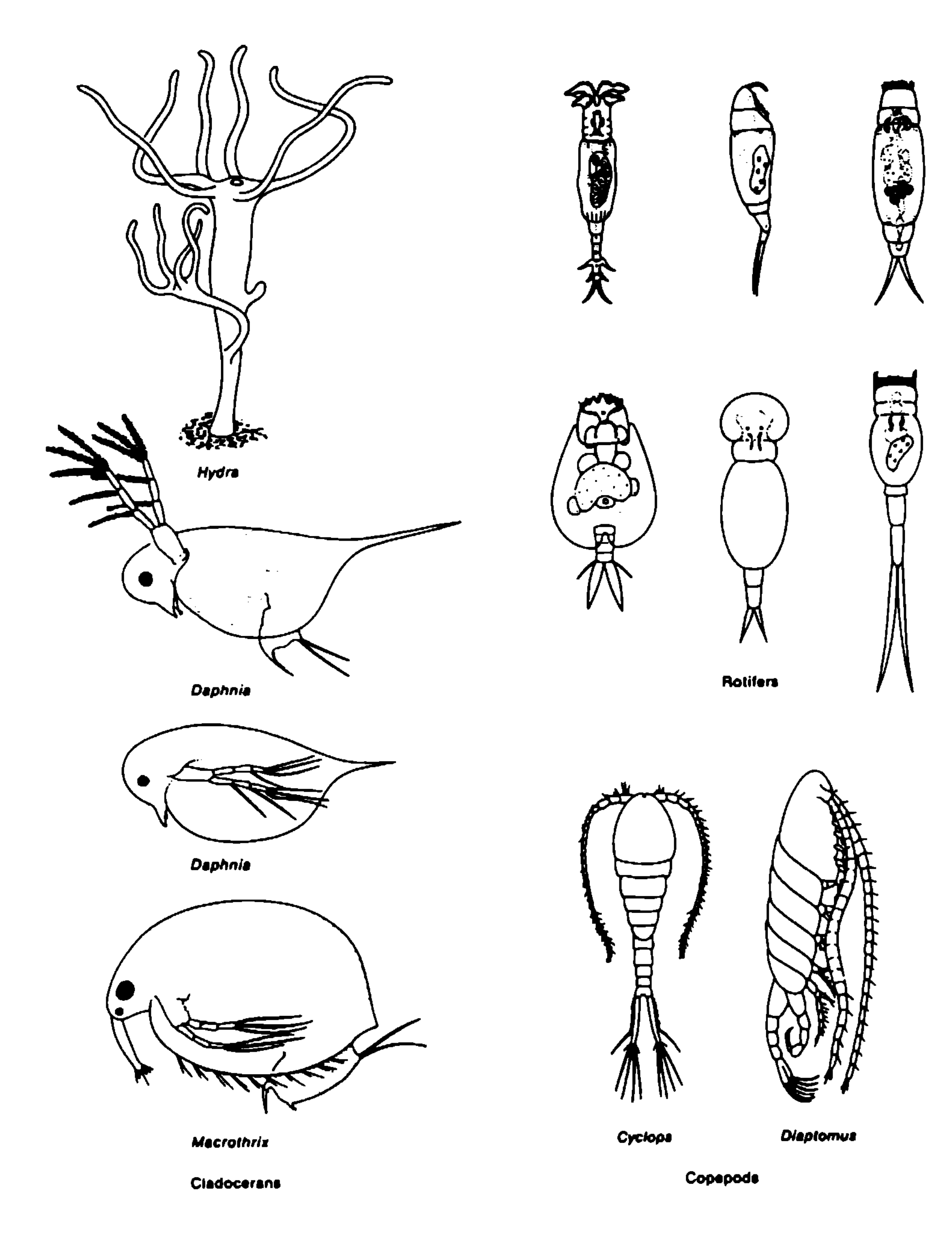
شكل- ١٣ : نماذج من الابتدائيات protozoans التي يمكن العثور عليها في مياه البركة



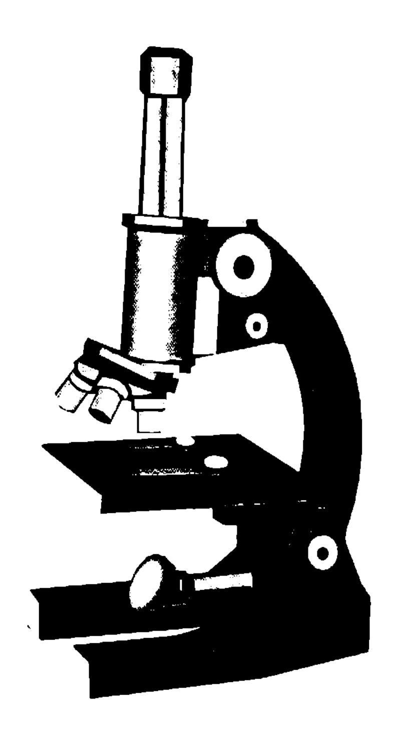
شكل- ١٤: نماذج من الطحالب أحادية الخلية التي يمكن العثور عليها في مياه البركة



شكل- ١٥: نماذج من الطحالب والبكتيريا الزرقاء- الخضراء cyanobacteria التي يمكن العثور عليها في مياه البركة.



شكل- ١٦ : نماذج من اللافقريات التي يمكن العثور عليها في مياه البركة.



المختبر الثالث

تركيب الخلية ووظيفتها

Cell Structure and Function

كما هو الحال في تنوع أشكال الكائنات الحية فإن هناك أيضاً تنوعاً في أشكال الخلايا المؤلفة لهذه الكائنات الحية ووظائفها. فالخلايا المنفردة مثل الأميبيا *Amoeba* والباراميسيوم *Paramecium* يمكن أن تعيش بشكل حر ومستقل. كما أن هناك خلايا أخرى تعيش بشكل مستعمرات مرتبة بشكل مفكك مؤلفة من خلايا متماثلة تتحرك من مكان لآخر. فضلاً عن ذلك فإن هناك حيوانات أخرى ثابتة غير متحركة تشكل جزءً من أنسجة النباتات والحيوانات الراقية وتعتمد على فعاليات متكاملة مع الخلايا الأخرى.

تختلف الخلايا من حيث الحجم، إذ يتراوح طول العديد من البكتريا حوالي ١ مايكرومتر بينما يكون حجم مح yolk بيضة النعامة (خلية منفردة أيضاً) يقارب حجم البرتقالة الصغيرة. وتقوم الخلايا بوظائف معينة مثل خلايا الدم الحمر التي تنقل الأوكسجين وثنائي أوكسيد الكاربون. ومهما كان شكل الخلية أو وظيفتها فإنها تمثل الوحدة الأساسية للمادة الحية إذ أنها تحتوي على جميع الخصائص والعمليات التي تمثل بمجموعها ما يسمى بالحياة. لقد لاحظ علماء الأحياء وجود نوعين من الخلايا:

١- الخلايا حقيقية النواة eukaryotic cells التي تحتوي على نواة محددة بشكل واضح ومحاطة بغشاء مزدوج الطبقات يفصلها عن بقية الخلية المتمثلة بالسايتوبلازم والذي يحتوي على العضيات organelles. ومن أمثلة الخلايا حقيقية النواة هي الابتدائيات protozoa والخلايا المكونة للفطريات fungi والنباتات والحيوانات.

٢- الخلايا بدائية النواة prokaryotic cells المتمثلة بمملكة الموانيرا kingdom Monera (البكتريا bacteria والبكتريا الزرقاء الخضراء cyanobacteria). وتكون هذه الخلايا فاقدة للغشاء النووي والعضيات السايتوبلازمية المحاطة بالأغشية. وأن البكتريا الزرقاء الخضراء كانت تسمى سابقاً بالأشنات الزرقاء – الخضراء blue-green algae حيث أنها تحتوي على تركيب محدد بغشاء يقوم بعملية التركيب الضوئي، وأن هذا التركيب يماثل مكونات البلاستيدات الخضراء الموجودة في النباتات الراقية. هناك عدد من الاختلافات الواضحة بين الخلايا بدائية النواة

وحقيقية النواة، إلا أنها تشترك بعدد من الخصائص. إذ أن كلا النوعين يحاط بغشاء بلازمي plasma membrane متماثل التركيب بالرغم من اختلاف وظيفته في كلا النوعين. إذ يعد الغشاء البلازمي في الخلايا بدائية النواة موقعاً للتفاعلات المؤدية إلى تحرير الطاقة بينما تحدث مثل هذه التفاعلات في أغشية المايتوكوندريا للخلايا حقيقية النواة. كما ويحتوي كلا النوعين على أنزيمات متماثلة و DNA يمثل المادة الوراثية ورايبوسومات تشترك في صنع البروتينات.

تعد الخلايا حقيقية النواة أكثر تقدماً من الخلايا بدائية النواة إذ أن لها تنظيماً معقداً، إلا أن اشتراكها في العديد من الخصائص المتماثلة يشير إلى نشوئها عن أصل أو سلف مشترك common ancestor في مرحلة التطور. وسيتم في هذا المختبر فحص أمثلة على الخلايا بدائية النواة وحقيقية النواة لكي تتعرف على التنوع الموجود في هذه المجاميع من الكائنات الحية.

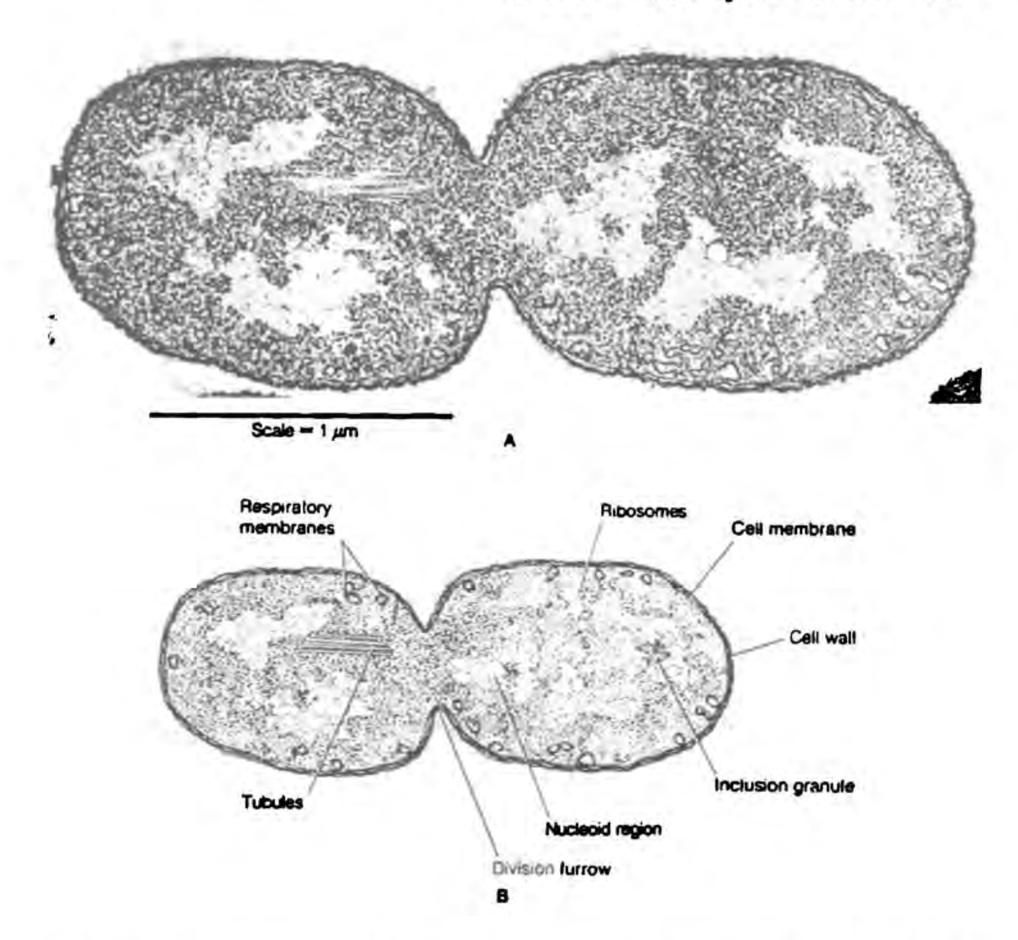
أ- الخلايا بدائية النواة:

١- البكتيريا Bacteria:

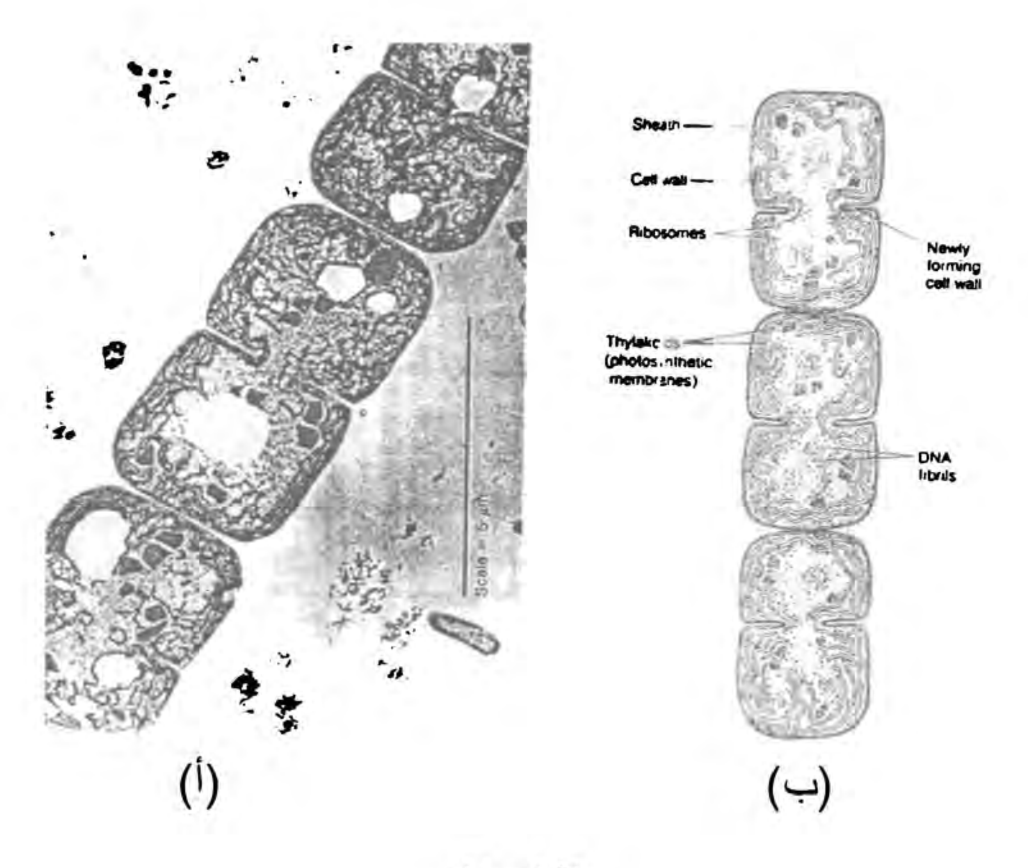
يوضح الشكل-١٧ صورة بالمجهر الإلكتروني للبكتريا المثبتة للنتروجين *Azotobacter vinelandii* والتي توجد في أرض الحديقة. وتظهر في هذه الصورة الخلية وهي تنقسم، حيث يتراوح حجم كل خلية ١× ١,٥ مايكرومتر. ويوضح مخطط هذه الجرثومة (الشكل-١٧) جدار الخلية cell wall والغشاء البلازمي والرايبوسومات والمنطقة الشبيهة بالنواة nucleoid region والتي تحتوي على DNA الذي لا يكون محدداً بغشاء.

لا يمكن ملاحظة التفاصيل التركيبية للخلايا بدائية النواة في المجهر الضوئي بسبب صغر حجمها. ومع ذلك يمكن رؤية بعضاً من خصائصها في حالة اصطباغها. ولعمل ذلك ضع قطرة من الصبغة البنفسجية البلورية crystal violet على شريحة زجاجية نظيفة. انقل باستعمال عروة اللقاح inoculating loop جرثومة *Bacillus*

subtilis (العصيّة الرقيقة) من مزرعة المرق broth culture إلى قطرة الصبغة الموجودة على الشريحة. امزج الجراثيم مع القطرة ثم ضع اشريحة. افحص التحضير في المجهر. ما هي التراكيب والعضيات الخلوية التي مكنك التعرف عليها والتي تكون واضحة في صورة المجهر الإلكتروني بجرثومة النيتروجين؟



شكل-١٧: بكتيريا *Azotobacter vinelandii* التي يمكن العثور عليها في تربة الحديقة. يمكن دراسة هذا النوع من البكتيريا باستخدام المجهر الإلكتروني النفاذ transmission electron microscope حيث يتضح بأن انقسام البكتيريا في مراحل الأخيرة.



شكل- ١٨:

(أ) صـورة *Anabaena* مـأخوذة بـالمجهر الإلكتروني النفـاذ transmission electron micrograph وهي من أنواع البكتريا الزرقاء الخضراء الخيطية التي تنمو في البرك والبحيرات حيث تحاط بغشاء جيلاتيني. تنقسم الخلايا لتكون جدار يفصل بين الخلايا المنقسمة.

(ب) رسم تخطيطي مفصل لتركيب *Anabaena* يوضح التركيب الدقيق لهذا النوع من البكتيريا.

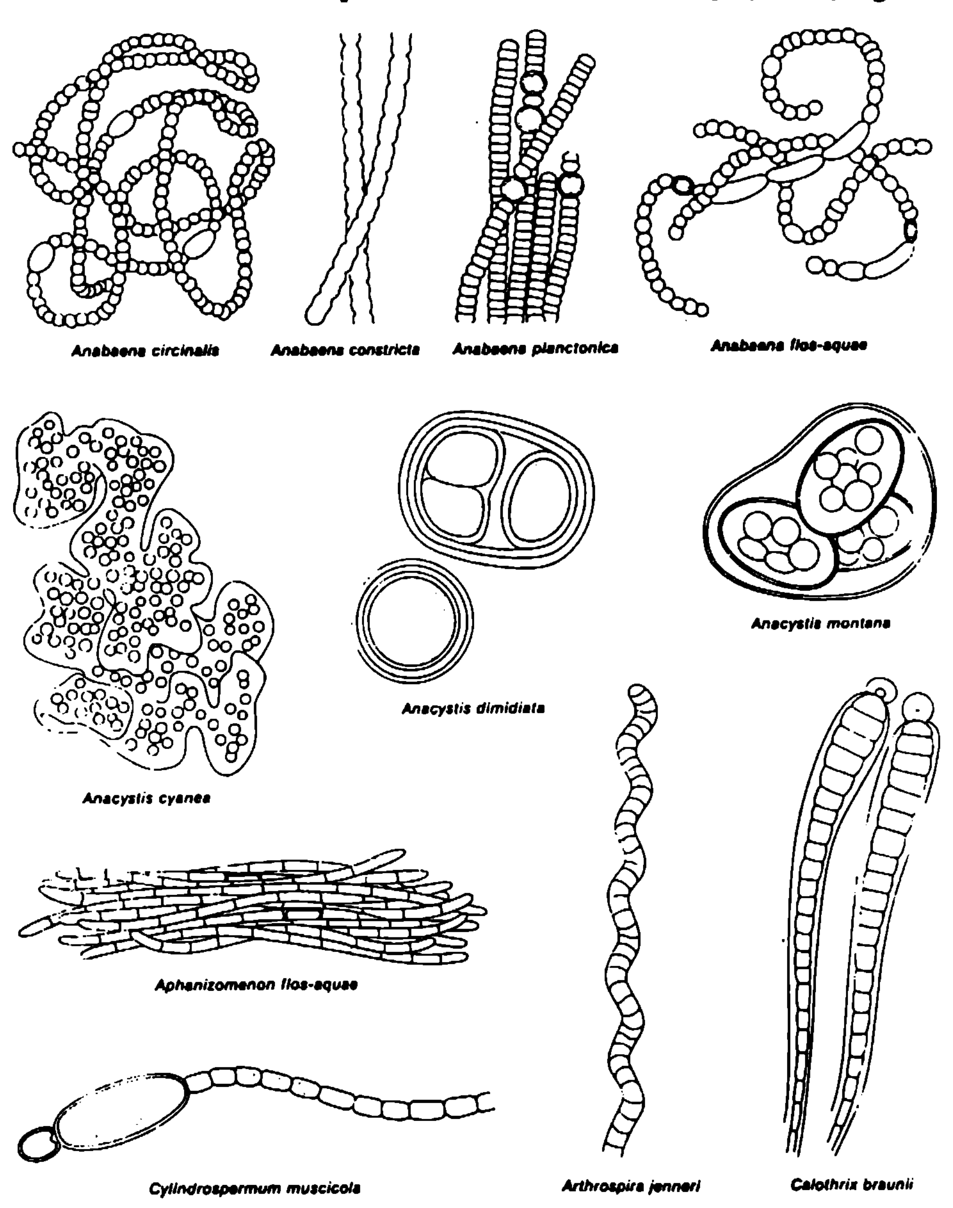
٢- البكتريا الزرقاء الخضراء Cyanobacteria:

إن التنظيم الداخلي للبكتريا الزرقاء الخضراء يكون مماثلاً لذلك الموجود في البكتيريا. وأن الاختلاف الرئيس يكمن في أن البكتريا الزرقاء الخضراء تحتوي على تراكيب غشائية تدعى الثايلاكويدات thylakoids التي تتواجد فيها صبغات عملية التركيب الضوئي photosynthetic pigments (الشكل- ١٨).

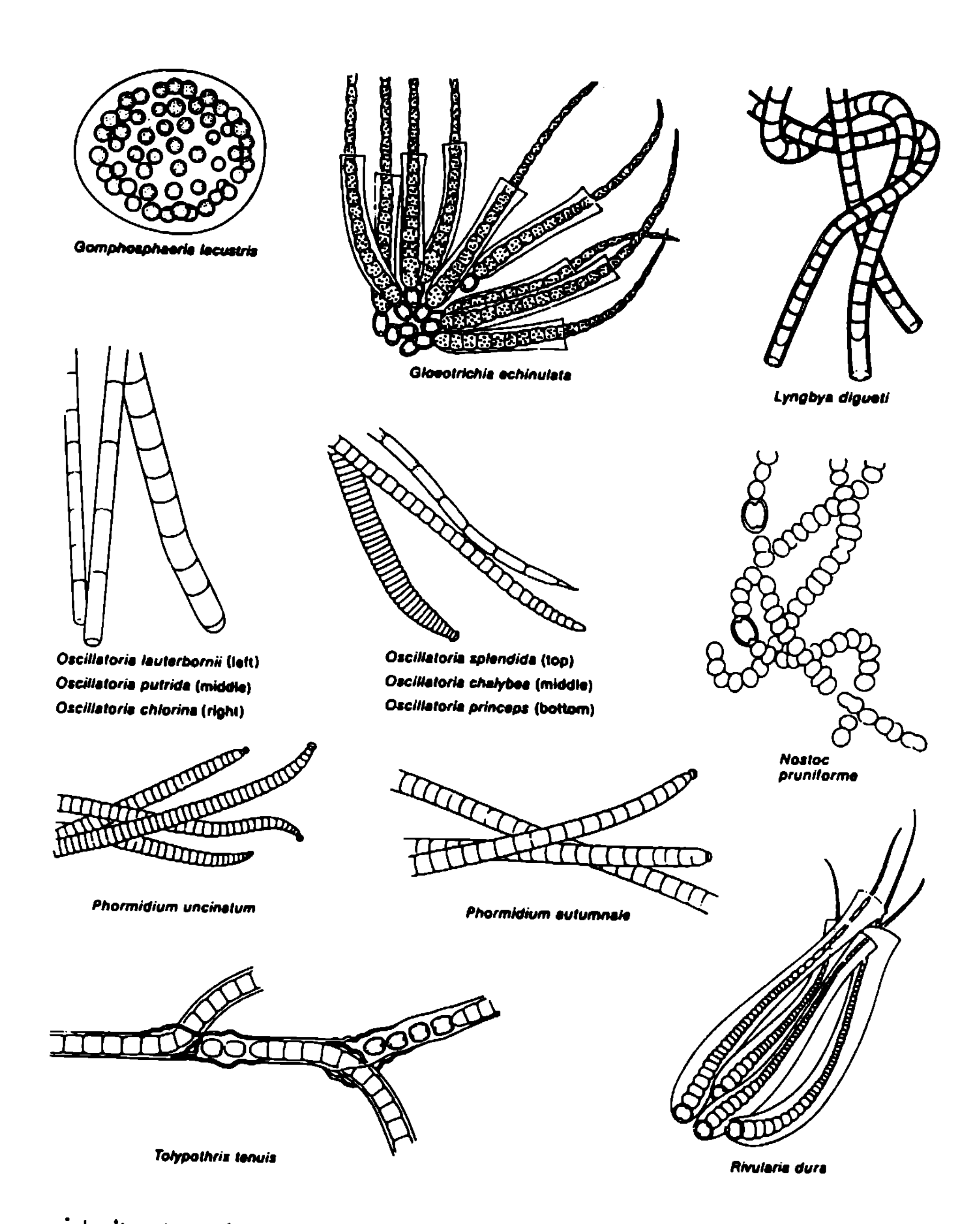
تعد البكتريا الزرقاء الخضراء من بين الكائنات المتواجدة في المياه السطحية. وقد أدى ذلك إلى حدوث بعض المشاكل إذ أن بزيادة النمو السكاني والمتطلبات الصناعية اعتمدت القرى والمدن على احتياجاتها المائية على المياه السطحية كالبحيرات والجداول والمستودعات بدلاً من المياه الجوفية ground water وأن المياه الجوفية تكون خالية من الكائنات الملوثة contaminated organisms بينما تحتوي المياه السطحية على العديد من الكائنات الحية التي تجعل الماء غير مستساغاً unpalatable. وأن مثل هذه الكائنات الحية لاسيما بعض البكتريا الزرقاء الخضراء تؤثر على رائحة الماء ومذاقه وتسد المرشحات filters وتنمو في الأنابيب وأبراج التبريد cooling towers وعلى جدران الخزانات كما وتكوّن شبكات على المياه السطحية وتنتج مواد سامة toxic materials. فضلاً عن ذلك تتفاقم هذه الحالة من خلال الطرق التي تقوم بها الشركات للتخلص من الفضلات. كما أن هناك مواد تزيد من نمو الأشنات algae وبقية الكائنات الحية مثل فضلات المجاري sewage waste والفضلات العضوية لمعامل الورق paper mills ومصانع تعليب الأسماك والمجازر slaughter houses ومعامل الحليب. ولغرض التعرف على هذه الكائنات الحية افحص شريحة زجاجية محضرة تجارياً تحتوي على أنواع مختلفة من البكتريا الزرقاء الخضراء.

فضلاً عن ذلك اجمع عينات للمياه السطحية من مصادر مختلفة مثل البحيرات والجداول والبرك ponds والخزانات reservoirs وجدران أحواض السباحة swimming pool walls والمرشحات filters ومصانع معامله المياه. قارن الكائنات الحية التي تشاهدها مع الشكل -١٩ لكي تتعرف على بعض البكتيريا الزرقاء -

الخضراء الموجودة في الإمدادات المائية water supplies. ويبين الجدول -١٠ بعض المشاكل المرتبطة بوجود هذه البكتريا الزرقاء الخضراء في الإمدادات المائية.



شكل-١٩: أنواع البكتيريا الزرقاء- الخضراء cyanobacteria التي يمكن ملاحظة وجودها في المياه السطحية الملوثة



شكل-٢٠: نماذج أخرى من البكتيريا الزرقاء- الخضراء التي يمكن ملاحظتها في عينات المياه السطحية الملوثة

الجدول- ١٠: المشاكل التي تسببها البكتريا الزرقاء الخضراء في الإمدادات المائية

المشكلة	نوع الكائن الحي
المذاق والرائحة	*Anabaena circinalis* *Anacystis cyanea* *Aphanizomenon flos- aquae* *Cylindrospermum muscicola* *Gomphosphaeria lacustris*
انسداد المرشحات	*Anabaena flos- aquae* *Anacystis dimidiata* *Gloeotrichia echinulata* *Oscillatoria princeps* *Oscillatoria chalybea* *Oscillatoria splendida* *Rivularia dura*
النمو على جدار الخزان	*Galothrix brounii* *Nostoc pruniforme* *Phormidium uncinatum* *Tolypothrix tenuis*
الماء الملوث	*Anabaena constricta* *Anacystis montana* *Arthrospira jenneri* *Lyngbya digueti* *Oscillatoria chlorina* *Oscillatoria putrida* *Oscillatoria lauterbornii* *Phormidium autumnale*

أ - الخلايا حقيقية النواة:

تختلف الخلايا الحقيقية النواة عن الخلايا بدائية النواة بشكل رئيس من حيث ارتباط DNA بالبروتينات وتنظيم هذا المعقد بشكل تراكيب كبيرة تدعى

الكروموسومات chromosomes. وتحاط الكروموسومات بغلاف نـووي عبـارة عـن غشاء مزدوج يفصل محتويات النواة عن السـايتوبلازم. وفي هـذا الجـزء مـن المختـبر سوف يتعرف كل طالب على التنوع الموجود في تركيب الخلايا حقيقية النـواة. قـارن كل خلية تفحصها مع الشكل العام للخلية كما في الشكل – ٢٠. ولغرض ملاحظـة العضيات الخلوية مثل المايتوكوندريا والبلاستيدات الخضراء والشـبكة الأندوبلازميـة وجهاز كولجي لابد من استعمال صبغات خاصة وقوة تكـبير عاليـة وإلا فـلا يمكـن ملاحظة هذه التراكيب في الخلايا التي تفحصها.

١ - خلايا البصل Onion Cells:

حضّر عينة رطبة من نسيج بشرة البصل باتباع الطريقة الموضـحة في الشـكل – ٢١. ثم افحص هذا النسيج باستعمال عدسة القوة الصغرى. إن الخطوط التي تشكل شبكة بين الخلايا هي عبارة عن جدران خلوية غير حية مكونـة بشـكل رئـيس مـن السليولوز. ويحيط جدار الخلية cell wall بالغشاء البلازمي الذي يحيط بالسايتوبلازم. وأن الجزء المركزي في العديد من الخلايا النباتية (والذي يصعب ملاحظته في الخلايـا الحية) يحتوي على فجوة مملوءة بالماء والأملاح. بعد ذلك افحص الخلايـا باسـتعمال عدسـة القـوة الكـبرى. حـدد موقـع النـواة والـتي تظهـر بشـكل تركيـب كثيـف في السايتوبلازم الشفاف. ويلاحظ في بعض الخلايا ظهور النـواة بشـكل دائـري ويبـدو أنها تقع في الجزء المركزي للخليـة. أمـا في الخلايـا الأخـرى فيبـدو أن النـواة تكـون مضغوطة وتندفع باتجاه جدار الخلية. وضحّ هذا التباين في شكل النواة وموقعها.

تنفصل الفجوة المركزية central vacuole والنواة وجدار الخلية عن السايتوبلازم بأغشية، إلا أنه يصعب ملاحظة هـذه الأغشـية في هـذا التحضـير. ويمكـن ملاحظـة المايتوكوندريا mitochondria في خلية البصل والتي هي عبارة عـن تراكيـب تسـهم في التنفس الخوي cellular respiration. ولغرض ملاحظـة هـذه العضـيات خـذ قطعـة أخرى من نسيج بشرة البصل واقطعها باستعمال شفرة بحيث يكـون حجمهـا ١× ٣ ملم. امزج ٣- ٥ قطرات من صـبغة الجـانوس الخضـراء ب (Janus Green B) مـع قطرة من محلول السكروز (٥٪) على شـريحة زجاجيـة وثبـت النسـيج وضـع غطـاء

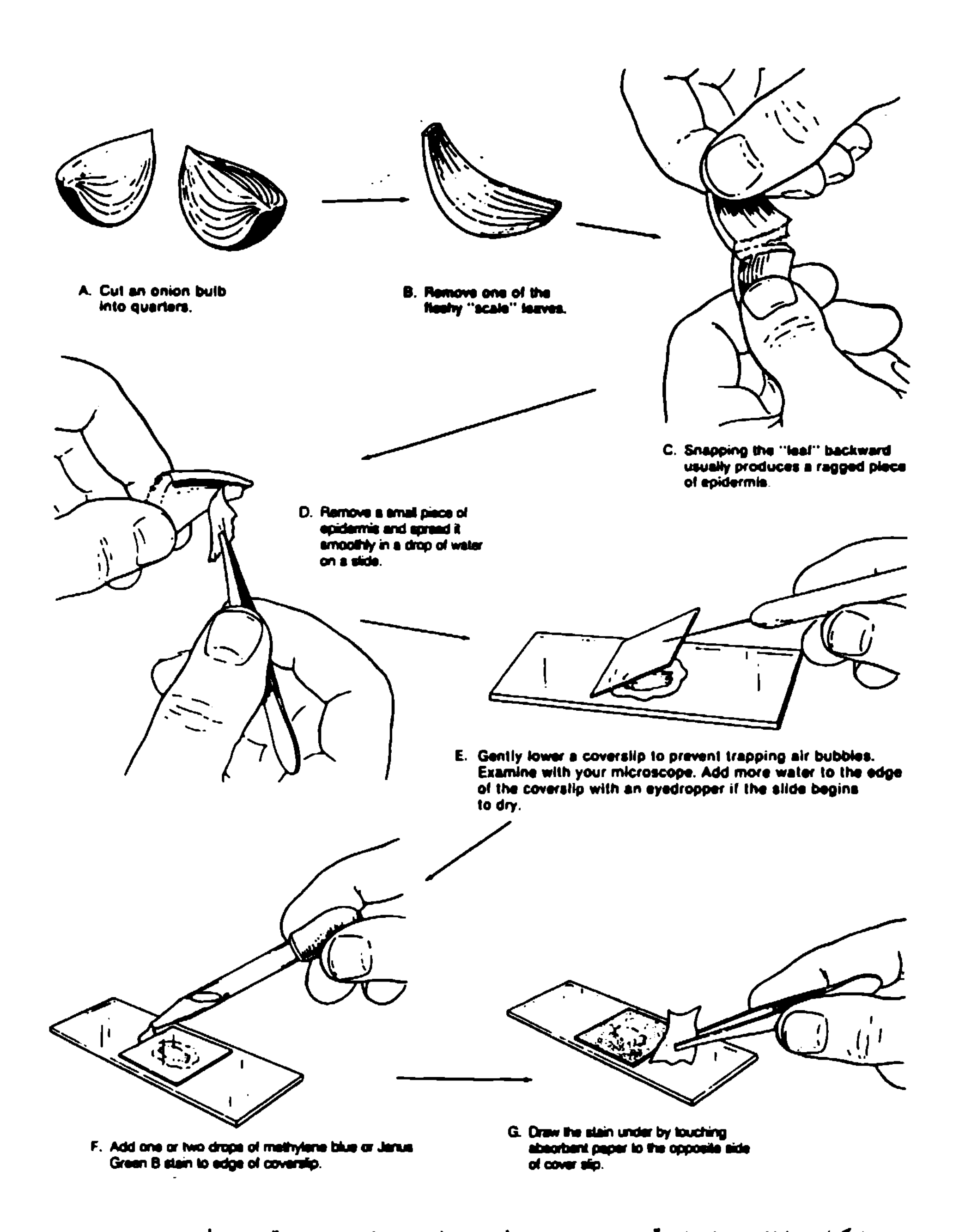
الشريحة. فإذا كان تحضيرك بسمك خلية واحدة فإنه سيظهر بشكل جدار الطابوق الشفاف عند النظر إليه تحت عدسة القوة الصغرى وباستعمال عدسة القوة الكبرى حدد موقع المايتوكوندريا والتي تظهر بشكل قضبان أو كرات صغيرة جداً عند حافة الخلية. ويجب أن يكون لونها أزرق عند أول فحص للتحضير. فإذا لم تكن كذلك أضف بضع قطرات من صبغة الجانوس الخضراء ب عند إحدى حافات غطاء الشريحة ثم اسحب الصبغة من التحضير باستعمال ورق ماص absorbent paper كما في الشكل – ٢١. وتفقد المايتوكوندريا المصبوغة لونها بعد حوالي (٥) دقائق نتيجة لتأثير أنزيم موجود في أغشيتها.

٢ - خلايا الأيلوديا *Elodea* Cells:

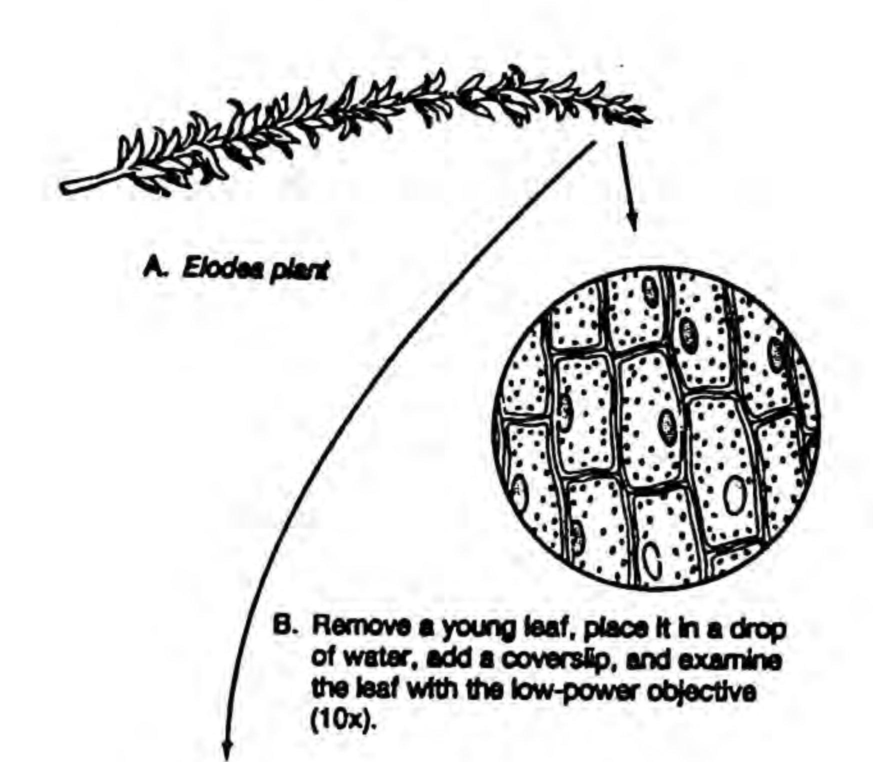
سيتم في هذا المختبر فحص الخلايا المأخوذة من أوراق النبات المائي aquatic plant المسمى بالأيلوديا *Elodea* (الشكل –٢٢). وتكون خلايا هذا النبات خضراء بسبب وجود البلاستيدات الخضراء chloroplasts التي تحتوي على صبغة تدعى الكلوروفيل chlorophyll. ويمثل التركيب الضوئي photosynthesis العملية التي بواسطتها تمتص هذه الصبغة الطاقة الضوئية وتحولها إلى طاقة كيمياوية في الجزيئات العضوية.

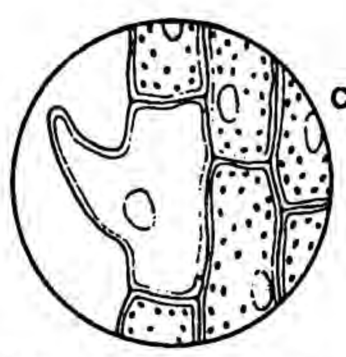
ضع ورقة فتية من قمة هذا النبات في قطرة ماء على شريحة زجاجية ثم ضع غطاء الشريحة coverslip. افحص مجموعة من الخلايا الواقعة قرب مركز الورقة. ثم استعمل القوة الكبرى. وضّح الصورة باستعمال المنظم الدقيق وحدد عدد الطبقات الخلوية. كيف يمكنك عمل ذلك؟

لاحظ أن الكلوروفيل يقع في تراكيب صغيرة في السايتوبلازم. وتدعى هذه التراكيب الصغيرة بالبلاستيدات الخضراء. افحص البلاستيدات الخضراء وسوف تلاحظ أنها تتحرك في السايتوبلازم. وتدعى هذه الحركة بالدوران cyclosis أو الجريان السايتوبلازمي cytoplasmic streaming.



شكل-٢١: مراحل تحضير شريحة لخلايا البصل لفحصها تحت المجهر الضوئي





شكل -٢٢ تحضير شريحة لخلايا نبات *Elodea* لفحصها تحت المجهر الضوئي

تحاط الخلية النباتية بجدار خلوي غير حي وغشاء بلازمي تصعب رؤيته بسبب انضغاطه باتجاه جدار الخلية نتيجة لضغط السائل السايتوبلازمي. ويمكن ملاحظة هذا الغشاء بوضع الخلية في محلول ملحي عالي التوتر hypertonic (المحلول الذي يكون

أكثر تركيزاً من السايتوبلازم). وفي مثل هذه الحالة ينتقل الماء من داخل الخلية إلى خارجها مسبباً انكماش الغشاء بحيث ينفصل عن جدار الخلية. ويمكن ملاحظة هذا الغشاء بسهولة عند زيادة التباين من خلال تنظيم الحجاب.

خذ ورقة أخرى من نبات الأيلوديا وضعها على شريحة زجاجية مع قطرة ماء ثم ضع غطاء الشريحة. افحص التحضير تحت عدسة القوة الصغرى. حدد مواقع الخلايا الشوكية spine cells عند حافات الورقة (الشكل – ٢٢). ادرس هذه الخلية تحت عدسة القوة الكبرى. أضف قطرة أو قطرتين من المحلول الملحي عالي التركيز hypertonic saline solution إلى إحدى حافات غطاء الشريحة ثم اسحب هذا المحلول من تحت الغطاء باستعمال قطعة من الورق الماص. كرر هذه الخطوة أكثر من مرة للتأكد من أن الماء الأصلي قد استبدل بالمحلول الملحي. ثم افحص الخلية الشوكية وسجل ملاحظاتك وفسرها.

٣ – خلايا بشرة الإنسان Human Epidermal Cells:

افحص الخلايا المأخوذة من بطانة البشرة الداخلية للخد باتباع الطريقة الموضحة في الشكل– ٢٣.

<u>تحذير</u>: يجب عدم إعطاء عود السن tooth pick المستعمل في أخذ عينة الخلايا إلى طالب آخر ويجب التخلص منه بعد الانتهاء من استعماله.

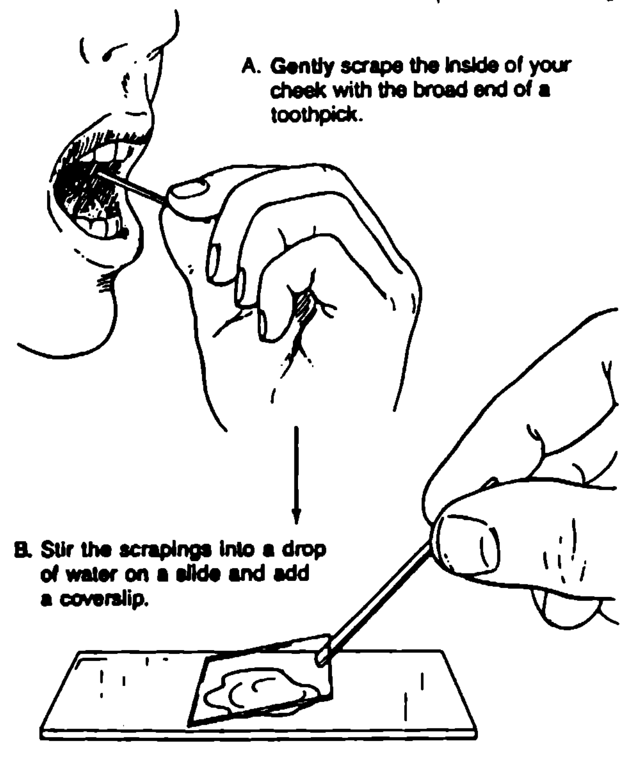
افحص الخلايا تحت عدسة القوة الكبرى. ما هي الصفات المشتركة بين خلايا بشرة الإنسان والخلايا النباتية؟ وكيف يمكن أن تختلف. إن حافات العديد من خلايا البشرة قد تكون منطوية على بعضها. ماذا يدل ذلك على سمك هذه الخلايا؟

أضف قطرة من المثيلين الأزرق methylene blue إلى حافة غطاء الشريحة ثم اسحبها. ما هو التركيب الذي يصطبغ بهذه الصبغة في الخلية؟

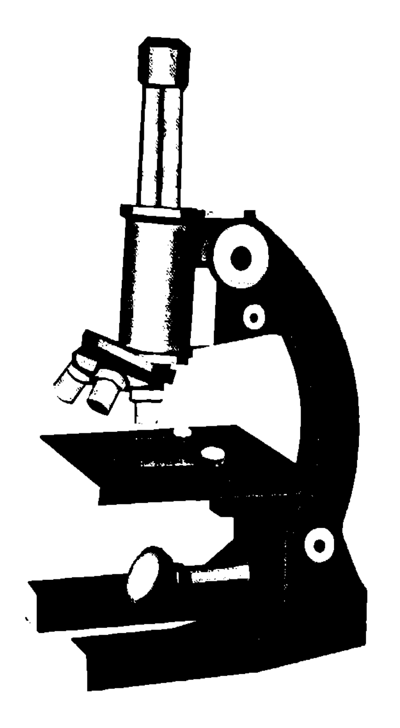
جـ – الجريان السايتوبلازمي (Cytoplasmic Streaming (Cyclosis:

يمكن ملاحظة ظاهرة الجريان السايتوبلازمي بسهولة في بلازموديوم plasmodium أحد الفطريات الغروية slime mold المسمى *Physarum polycephalum*. وأن

البلازموديوم عبارة عن كتلة بروتوبلازمية متعددة النوى خالية من جدار الخلية. وأن هذا الكائن الحي يخرج بسهولة من طور السبات dormant stage الذي هو عبارة عن تركيب قشري صلب يدعى السكليروشيوم sclerotium، ويتم الانتقال من طور السبات من خلال وضع قطع صغيرة من السكليروشيوم على مادة رطبة محتوية على مواد غذائية مثل اكار agar. وخلال فترة قصيرة يبدأ الكائن الحي بالنمو خارج السطح. وتصبح قنوات جريان السايتوبلازم واضحة بعد ٧٢ ساعة من النمو. افحص بلازموديوم فطر الفايزارام *Physarum* النامي على الأكار في صحن بتري petri dish . اترك غطاء الصحن في الوقت الذي تفحص فيه الكائن احي بدقة باستعمال المجهر التشريحي. ما هو الشي الذي يبدو غير اعتيادياً بالنسبة للجريان السايتوبلازمي في فطر الفايزارام؟



شكل- ٢٣: تحضير بعض الخلايا من البشرة epidermal cell من أجل فحصها في المجهر الضوئي



المختبر الرابع

تركيب العضيات الخلوية ووظائفها

Subcellular Structures and Functions

إن المشكلة الأساسية في الجاهر الضوئية هي محدودية قدرة التبيّن resolution. إذ أن التراكيب الخلوية التي تكون أصغر أو تقترب من ٠,١ مايكرومتر micrometer لا يمكن رؤيتها بوضوح في المجهر الضوئي. وأن الأغشية الخلوية وبقية عضيات الخلية هي في الحقيقة أصغر من ذلك.

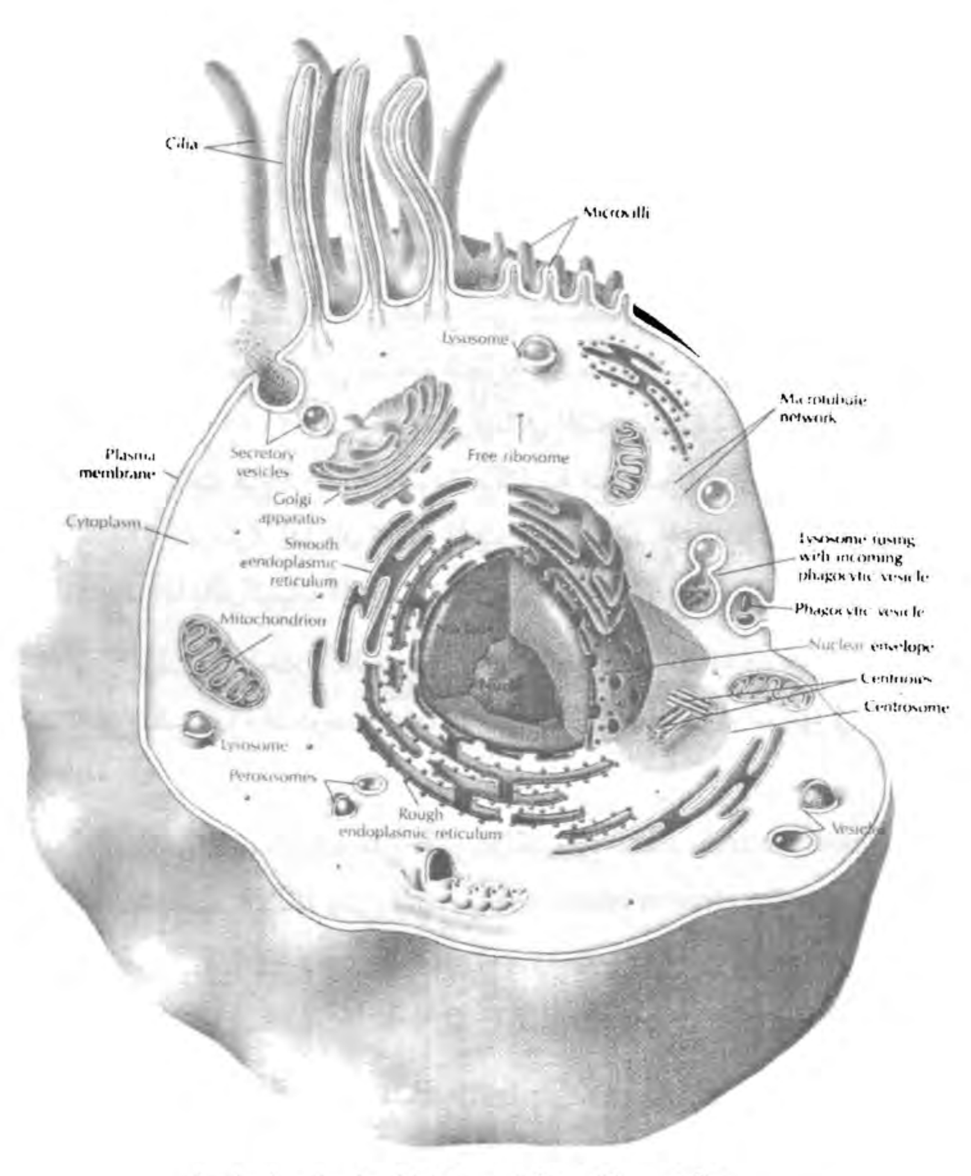
وتستعمل في الوقت الحاضر الجاهر التي تستخدم فيها الإلكترونات لغرض الإضاءة بدلاً من الضوء. ومن الناحية النظرية فإن قدرة التبيّن في مثل هذه الأجهزة قد تكون أكبر بـ ١٠٠٠٠٠ مرة من نظيرتها في الجاهر الضوئية وذلك لأن طول موجة الإلكترونات هي ٠,٠٠٥ نانومتر بالمقارنة مع طول موجة الضوء المرئي (حوالي ٥٠٠ نانومتر). لذا فإن تطور المجهر الإلكتروني electron microscope قد عزز من معرفتنا بالتراكيب الخلوية.

لقد تعرفت في المختبر الثالث على تركيب الخلايا النباتية والحيوانية كما تظهر تحت المجهر الضوئي، وقد درست عدداً من أنواع الخلايا من حيث تنوعها في التركيب والوظيفة.

وفي هذا المختبر ستتعرف على المجهر الإلكتروني النفاذ transmission electron microscope والمجهر الإلكتروني المتفرّس scanning electron microscope وكذلك تركيب بعض الأجزاء الخلوية ووظائفها. كما وستتعرف على كيفية تحديد أبعاد الأجسام الصغيرة التي يمكن ملاحظتها في المجهر الإلكتروني.

أ- التنظيم الداخلي للخلية Subcellular Organization:

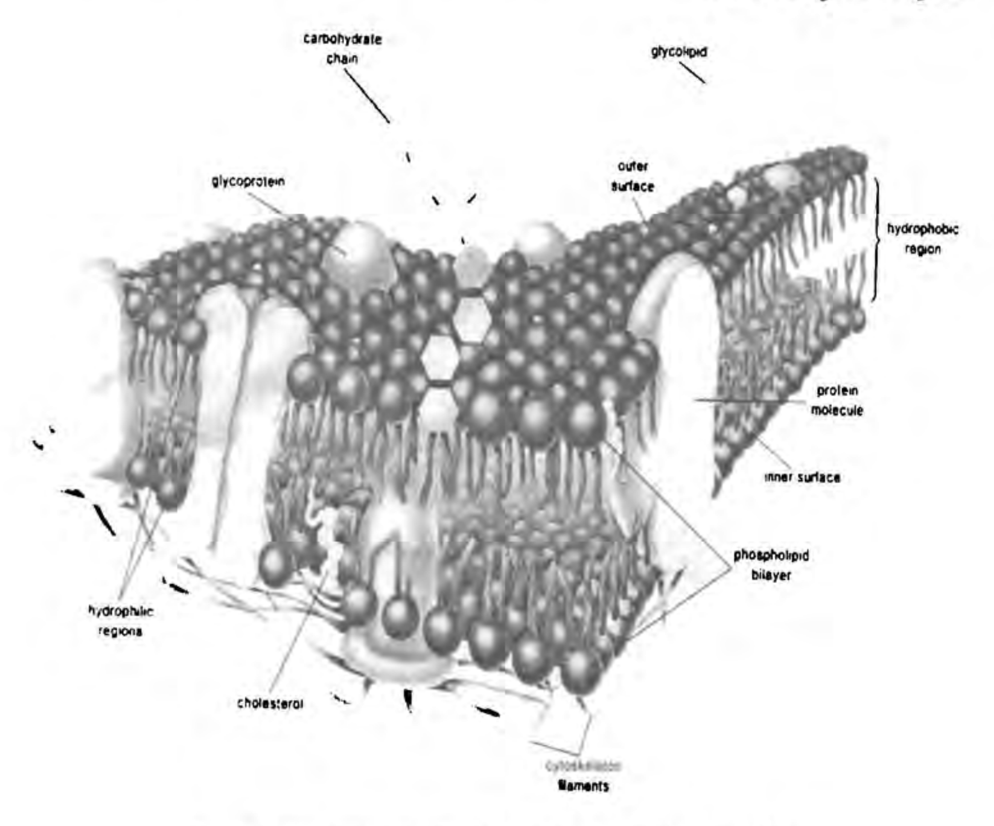
لقد أظهر المجهر احتواء الخلايا حقيقية النواة على العديد من التراكيب المتخصصة التي تقوم بإنجاز الفعاليات المختلفة. وتتضمن هذه الفعاليات الحصول على المواد الغذائية وتمثيلها، والتخلص من الفضلات، وصنع مواد خلوية جديدة، والحركة والتكاثر. وتحتوي جميع الخلايا على عضيات متخصصة specialized organelles تقوم بإنجاز هذه الوظائف. لذا تعد الخلية وحدة متكاملة عالية التركيب (الشكل-٢٤).



شكل – ٢٤: خلية حيوانية animal cell نموذجية.

لقد كانت تصور الخلايا منذ فترة ليست بالبعيدة على أنها تراكيب مملوءة بالسائل وتحتوي على الأنزيمات وبقية الجزيئات الذائبة مع النواة وعدد من المايتوكوندريا والقليل من العضيات الأخرى التي يمكن رؤيتها باستعمال صبغات معينة. ومع تطور الطرق المجهرية الحديثة تم التعرف على العديد من التراكيب التي

يؤدي كل واحد منها وظيفة متخصصة. وفضلاً عن تنوع العضيات، فإن المجهر الإلكتروني قد كشف عن الارتباطات غير المعروفة سابقاً بين التراكيب الخيطية filamentous structures في السايتوبلازم وتشكل هذه التراكيب هيكل الخلية cytoskeleton الذي يحافظ على شكل الخلية ويُمكنها من الحركة ويعمل على تثبيت عضيات الخلية المختلفة.



شكل- ٢٥: تركيب غشاء الخلية fluid- mosaic model

١- الغشاء البلازمي The Plasma Membrane:

توجد الخلايا بشكل وحدات منفصلة ومتميزة بسبب إحاطتها بالغشاء البلازمي الذي ينظم حركة المواد من الخلية وإليها. ولا يمكن رؤية هذا الغشاء تحت المجهر الضوئي. ويظهر الغشاء البلازمي (غشاء الخلية) تحت المجهر الإلكتروني النفاذ على

أنه غشاء مزدوج رقيق يتراوح سمكه ٦-٩ نانومتر. ويتخذ غشاء الخلية نموذج الفسيفساء السائل fluid mosaic model (الشكل -٢٥) إذ أن غشاء الخلية الحيوانية يكون مؤلف من طبقة مزدوجة من الدهون lipid bilayer مكونة من جزيئات الكولسترول cholesterol والدهون الفسفورية phospholipid التي تتجه نهاياتها النافرة للماء hydrophobic ends نحو الداخل. وتحتوي طبقة الدهون الثنائية أو تتصل بها بروتينات تقوم بإنجاز عدد من الوظائف. ويمكن لهذه البروتينات أن تتحرك ضمن طبقة الدهون لأن هذه الطبقة في حالة سائلة. وهناك سلاسل كاربوهيدراتية قصيرة متصلة بعدد من الجزيئات البروتينية والدهون الفسفورية وتتصل هذه السلاسل بالسطح الخارجي حيث تعمل كمواقع تمييز جزيئية molecular recognition sites لارتباط الهرمونات والأجسام المضادة antibodies وبقية الجزيئات التنظيمية regulatory molecules وهناك بروتينات أخرى مرتبطة بالغشاء ومواجهة للسايتوبلازم. وإن جميع الأغشية البلازمية لها التركيب نفسه وأن الاختلافات هي في أنواع الدهون والبروتينات والكاربوهيدرات الموجودة في هذه الأغشية. وتعد هذه الاختلافات مهمة وذلك لأن التغايرات الموجودة في جزيئات الغشاء هي التي تعطي خصائص مختلفة للأغشية والتي ترتبط بوظائف الأنواع المختلفة من الخلايا والعضيات.

إن تركيب الأغشية في الخلايا بدائية النواة والنباتات هو نفسه في الخلايا حقيقية النواة باستثناء معظم الخلايا بدائية النواة التي لا تحتوي الطبقات الدهنية لأغشيتها على الكولسترول بل تحتوي على ستيرويد آخر له وظيفة مماثلة للكولسترول.

٢- النواة Nucleus:

وهي عبارة عن تركيب كروي عادة كبير الحجم محاط بغشائين يشكلان الغلاف النووي nuclear envelope (الشكلين- ٢٤و ٢٦) ويلتحم الغشاءان بمسافات معينة لتكوين الثقوب pores التي تمر من خلالها المواد بين النواة والسايتوبلازم. وتحتوي النواة (باستثناء نواة الكميت gamete) على النسخة الكاملة من المعلومات الوراثية (DNA) التي تحدد نمو الكائن الحي وتتحكم بوظائفه المختلفة من خلال

التأثير على فعاليات كل خلية لضمان قيام الخلية بصنع الجزيئات المعقدة المختلفة التي تحتاجها الخلية.

٣- الشبكة الأندوبلازمية والرايبوسومات

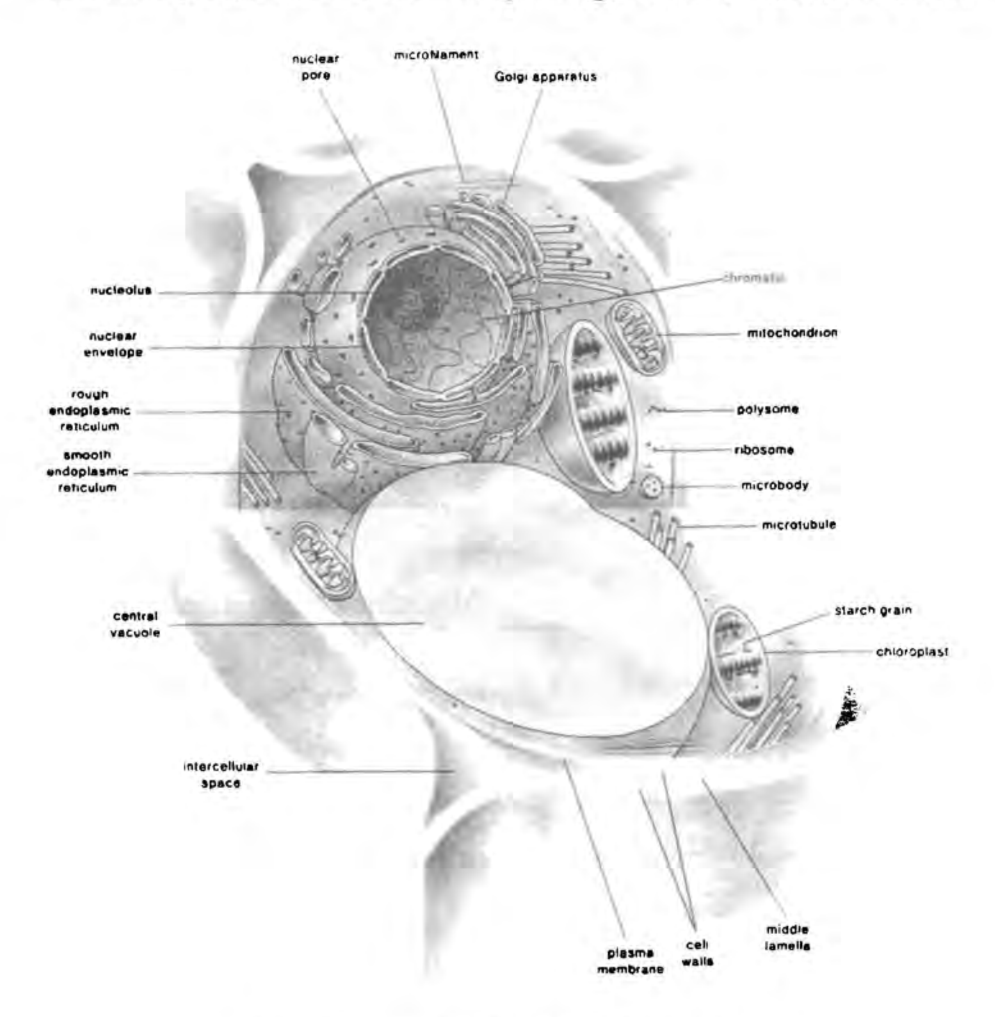
Endoplasmic Reticulum and Ribosomes

إن الشبكة الأندوبلازمية عبارة عن شبكة من الأكياس المسطحة flattened sacs والأنابيب tubes والقنوات channels المنتشرة في سايتوبلازم الخلية. وأن تركيب أغشية الشبكة الأندوبلازمية هو نفسه تركيب الغشاء البلازمي، وفي أحيان كثيرة يتصل غشاء الشبكة الأندوبلازمية مع غشاء النواة والغشاء البلازمي. وقد تكون أغشية الشبكة الأندوبلازمية خشنة rough أو ملساء smooth. فالخلايا الفعالة في صنع البروتينات تحتوي على الشبكة الأندوبلازمية الخشنة، وقد سميت خشنة rough بسبب وجود تراكيب تدعى الرايبوسومات. وتتألف الرايبوسومات من البروتين والحامض النووي الرايبوزي RNA أما الشبكة الأندوبلازمية الملساء فتكون خالية من الرايبوسومات. ويعتقد أن البروتينات المصنوعة في الرايبوسومات تتحرر إلى قنوات الشبكة الأندوبلازمية حيث تخزن ثم تنقل إلى بقية أجزاء الخلية أو إلى خارج الخلية.

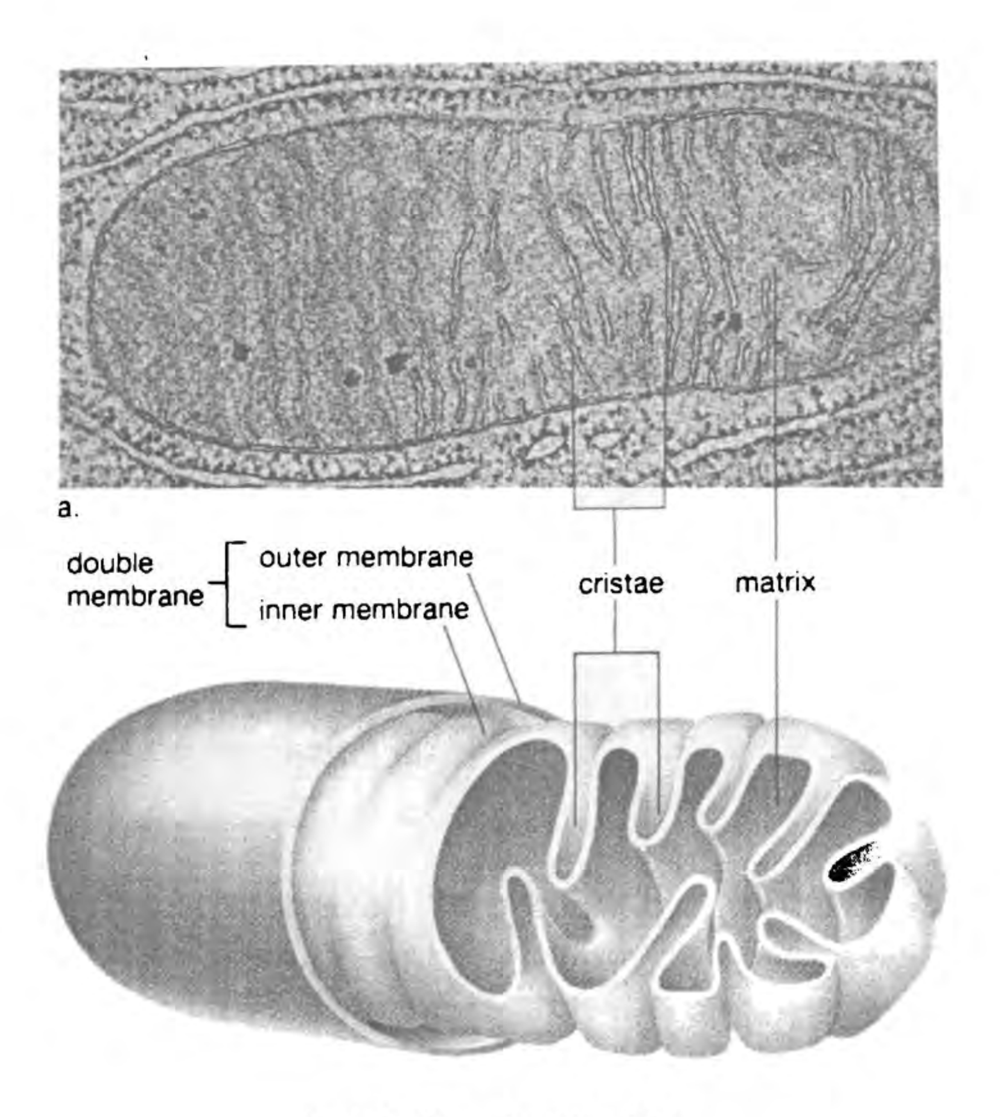
٤- المايتوكوندريا Mitochondria:

وهي عبارة عن تراكيب خلوية تسهم في تنفس الخلية cell respiration ويُظهر المجهر الإلكتروني أن المايتوكوندريا تتألف من غشاء خارجي outer membrane وغشاء داخلي inner membrane ينبعج نحو الداخل بشكل طيات تدعى cristae (الشكل –٢٧). ويزداد عدد هذه الطيات بزيادة فعالية المايتوكوندريا. وتمتلىء الفسحة الواقعة بين الغشائين بسائل يحتوي على بعض أنزيمات دورة كريبس Krebs cycle.وتحتوي سطوح الأغشية الداخلية والخارجية على الآلاف من الدقائق الصغيرة small particles. وتتصل هذه الدقائق بالسطح الداخلي بواسطة سويقات stalks، حيث تحتوي على العديد من الأنزيمات والجزيئات الحاملة للإلكترونات electron carrier molecules والتي تسهم في عملية التنفس الخلوي. أما الدقائق الموجودة على

سطح الغشاء الخارجي فتكون خالية من السويقات وتقوم بإنجاز العديد من التفاعلات التي تؤدي إلى توفير الإلكترونات إلى داخل المايتوكوندريا. وتسهم الدقائق المرتبطة بسطح الغشاء الداخلي بنقل الإلكترونات على طول سلسلة جزيئات نقل الإلكترونات وفي النهاية يتم صنع الأدينوسين ثلاثي الفوسفات adenosine triphosphate (ATP) بعملية تدعى الفسفرة التأكسدية oxidative phosphorylation.



شكل- ٢٦: خلية نباتية plant cell نموذجية



شكل- ٢٧: تركيب المايتوكوندريا

٥- جهاز كولجي Golgi Apparatus:

وهو عبارة عن تركيب آخر من الأغشية الموجودة في الخلايا النباتية والحيوانية. إن جهاز كولجي يتألف من أكياس مسطحة تدعى cisternae. وعند الحافات تكوّن الأكياس حويصلات كروية spherical vesicles بعملية pinching off process. كما ويستلم جهاز كولجي الحويصلات المتكونة في الشبكة الأندوبلازمية حيث يعمل على

تحوير أغشية هذه الحويصلات مع عمليات أخرى ثم يعمل على توزيع محتوياتها إلى بقية أجزاء الخلية لاسيما سطح الخلية. ويعد جهاز كولجي مركز الرزم packaging والتوزيع distribution في الخلية. إذ أن التجميع النهائي للبروتينات والكاربوهيدرات المختلفة المرتبطة بأغشية الخلية والعضيات يحدث في جهاز كولجي.

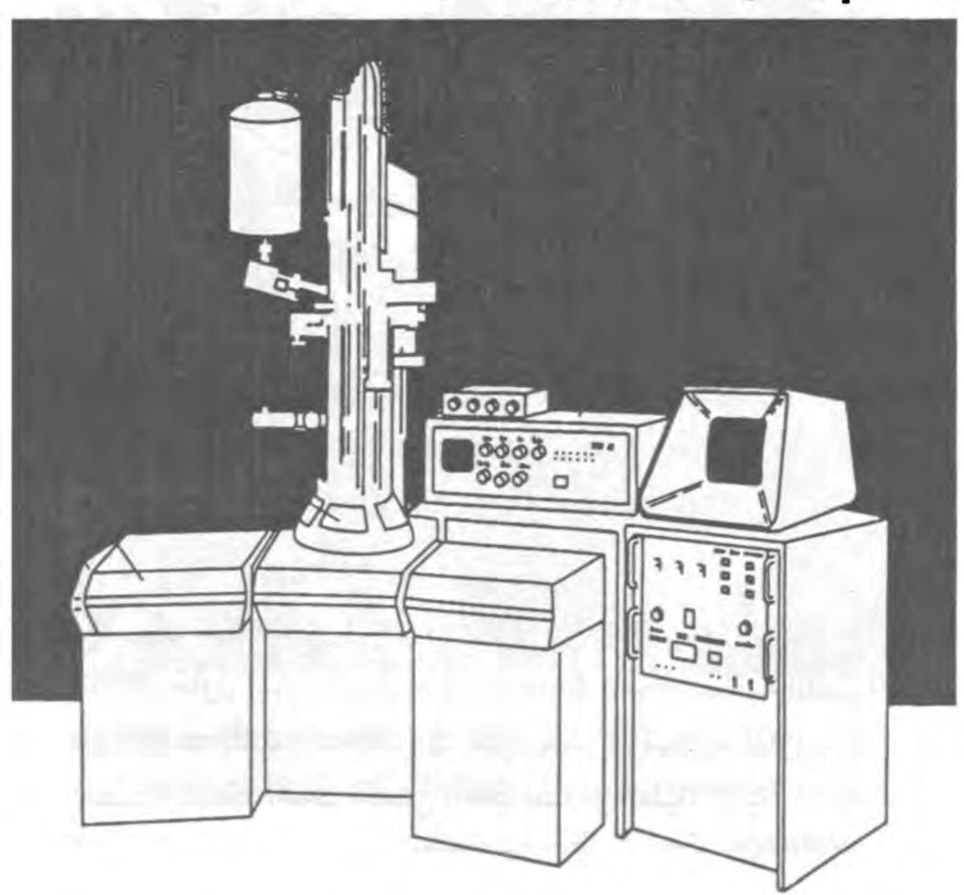
ب- المجهر الإلكتروني النفاذ Transmission Electron Microscope:

يوضح الشكل- ٢٨ المجهر الإلكتروني النفاذ. إذ يتألف هذا المجهر من عمود column مركزي طويل ومعدات إلكترونية مختلفة تتضمن كاشف حزمة الأشعة beam detector وشاشة لتصوير أشعة الكاثود (القطب السالب) cathode ray viewing screen ومضخات تفريغ vacuum pumps ومكونات كهربائية. فالمجهر الإلكتروني عبارة عن أنبوب تلفزيوني عمودي ومصدر للإلكترونات (بندقية الإلكترونات electron gun) في قمة الجهاز وشاشة عرض عند القاعدة. وإن الإلكترونات تخرج من الخيط الساخن لبندقية الإلكترونات، وأن الفولتية العالية تعجل من هذه الإلكترونات باتجاه شاشة العرض.

ويجب إفراغ العمود من الهواء لكي تمر الإلكترونات دون إعاقة. وأن المغناطيس الموجود على العمود يعمل بشكل أشبه بعقد التنظيم الموجودة في المجهر الضوئي لغرض تركيز جريان الإلكترونات على العينة specimen وعندما تصطدم الإلكترونات بالشاشة فإنها تتوهج. وعند تهيئة العينة بشكل جيد ووضعها في الحامل holder الموجود في العمود فإن صورة العينة ستظهر على الشاشة بشكل مناطق مظلمة dark ومضيئة light.

وترتبط المناطق المظلمة بمناطق العينة المعتمة للإلكترونات electron- opaque regions وذلك لأن الإلكترونات سوف تنحرف ولا تمر خلال هذه المناطق. أما المناطق المضيئة فتمثل مناطق العينة الشفافة للإلكترونات electron- transparent areas وأن الصور المتكونة للعينات يتم تصويرها فوتوغرافياً.

وتتم هذه العملية من خلال تحريك الشاشة عن طريق الإلكترونات وجعل الإلكترونات تصطدم بفلم التصوير الفوتوغرافي. وتؤدي هذه الطريقة إلى الحصول على صور مماثلة لتلك الموجودة في الشكلين ٢٩- ٣٠. ولابد من الإشارة إلى أن صور المجهر الإلكتروني النفاذ لا يمكن أن تؤخذ إلا في حالة المقاطع الرقيقة جداً للمادة. لذا فإن تركيباً ما في الخلية قد لا يظهر في الصورة وذلك لعدم احتواء ذلك المقطع على هذا التركيب. وعليه لابد من تذكر هذا المبدأ عند استعمال صور المجهر الإلكتروني لتحليل الخلايا لمعرفة وجود العضيات المختلفة.



شكل- ٢٨: المجهر الإلكتروني النفاذ transmission electron microscope

جـ- المجهر الإلكتروني المتفرّس Scanning Electron Microscope:

إذا كنا نتصور بأن المجهر الإلكتروني النفاذ يناظر المجهر الضوئي المركب فإن المجهر الإلكتروني المتفرّس هو نسخة مطابقة للمجهر التشريحي. وعند تهيئة العينات للمجهر الإلكتروني المتفرّس فإنها تستعمل بكاملها وليست مقطعة وذلك لأن الصورة تتكون نتيجة لانعكاس الإلكترونات وليس لنفاذها. وكما يلاحظ في الشكل – ٣١ فإن صور المجهر الإلكتروني المتفرّس تكون ثلاثية الأبعاد three- dimensional.
ما هي الميزات التي يقدمها المجهر الإلكتروني المتفرّس على المجهر الإلكتروني النفاذ؟

د - تفسير صور المجهر الإلكتروني وقياساتها

أ - استعمال تكبير الصور المجهرية

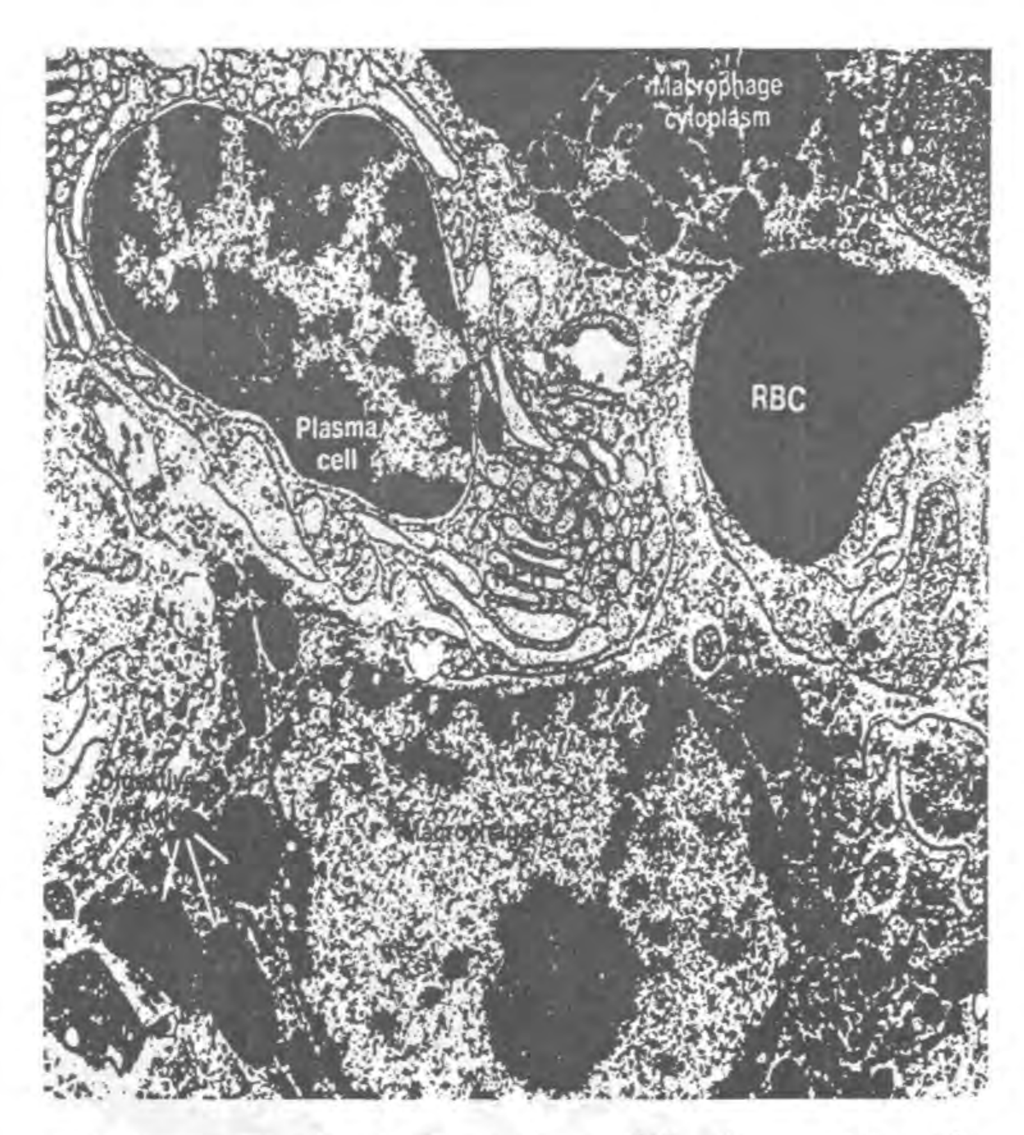
١- افحص الصور المجهرية في الشكلين ٢٩و ٣٠. ما هو عدد الخلايا المرئية وما نوع هذه الخلايا؟

ابحث عن التراكيب المختلفة في الخلايا وحاول أن تجد النوى والمايتوكوندريا والشبكة الأندوبلازمية وجهاز كولجي والأغشية البلازمية. وإذا لم تستطع أن تجد تركيب معين فهل يمكنك الافتراض بأنه غير موجود في الخلية؟ وضح ذلك.

٢- لاحظ بأن قوة التكبير في الشكل- ٢٩ هي 11390X وفي الشكل-٣٠ هي 8545X. حاول قياس أطول بُعد longest dimension للخلية الملتهمةالكبيرة macrophage بالمليمترات (ملم) ثم حوّل هذا الرقم إلى مايكرومترات (um) ـــــــ. ولتحديد الحجم الحقيقي للخلية استعمل الصيغة الآتية:

$$\text{الحجم الحقيقي} = \frac{\text{حجم الخلية الذي تم قياسه (مايكرومتر)}}{\text{قوة تكبير الصورة المجهرية}}$$

ماهو طول بُعد للخلية الملتهمة الكبيرة بالمايكرومترات؟



شكل- ٢٩: صورة بالمجهر الإلكتروني النفاذ حيث تظهر خلية ملتهمة macrophage وخلية بلازما plasma cell حاوية على شبكة أندوبلازمية وكذلك يلاحظ كرية دم حمراء erythrocyte. لاحظ أن الفجوات الهضمية digestive vacuoles في الخلايا الملتهمة حيث أن وظيفتها هو تحليل المواد الملتهمة بعملية البلعمة phagocytosis.



شكل- ٣٠: صورة بالمجهر الإلكتروني للعقد اللمفاوية حيث تظهر اللمفوسايت وهي من الكريات البيضاء حيث أن كل كرية تحوي على نواة وكل خلية ملتهمة macrophage تحوي على مايتوكوندريا وكل خلية شبكية reticular cell تحوي على ليف شبكي reticular fiber.



شكل- ٣١:

(أ) صورة بالمجهر الإلكتروني (المتفرس) الماسح للعظم compact bone
(ب) صورة بالمجهر الضوئي compact bone.

لاحظ الفجوات lacunae التي توجد فيها خلايا العظم osteocytes والقنوات canaliculi التي تربط الفجوات مع بعضها وقناة هافرس Haversian canal

فإذا قطعت الخلية للخلية الملتهمة الكبيرة في هذه الصورة إلى ٤٠ مقطع سُمك كل واحد منها ٤٠ نانومتر، فما هي عدد المقاطع sections التي يمكن الحصول عليها إذا كان القطع بطول الخلية بكاملها؟

ما هي ميزات فحص أكثر من مقطع واحد لخلية أو نسيج؟

٣- حاول قياس الخلايا والعضيات الآتية وحدد أحجامها:

أ- من الشكل- ٢٩:

حجم خلية البلازما (أطول بُعد) ـــــــ مايكرومتر

حجم خلية الدم الحمراء (أطول بُعد) ـــــــ مايكرومتر

سمك شبكة أندوبلازمية واحدة ـــــــ مايكرومتر

ب- من الشكل-٣٠ :

طول المايتوكوندريون ـــــــ مايكرومتر

لماذا تعتقد بأن بعض المايتوكوندريا في هذه الصورة المجهرية تبدو دائرية والأخرى تبدو متطاولة؟

حجم نواة الخلية اللمفاوية ـــــــ مايكرومتر

عرض الغشاء البلازمي ـــــــ مايكرومتر

جـ- من الشكل- ٣١:

حجم فجوة العظم (أطول بُعد) ـــــــ مايكرومتر

عرض قناة هافرس ـــــــ مايكرومتر

حجم القُنية (الطول) ـــــــ مايكرومتر

ب - استعمال مقياس الدلالة على الصورة المجهرية

تحتوي بعض صور المجهر الإلكتروني على مقياس يشير إلى طول مقداره (١) مايكرومتر. ويمكنك استعمال مقياس الدلالة هذا لقياس حجوم العضيات الخلوية. أما الخيار الآخر فهو اتباع الخطوات الآتية:

١- حاول قياس حجم هذا المقياس بالمليمترات وعيّن العامل العشري decimal factor الذي يتم الحصول عليه من حساب عدد المايكرومترات المساوية لـ (١) مليمتر. لذا فإن:

$$\text{العامل العشري} = \frac{\text{(١) مايكرومتر}}{\text{طول مقياس الدلالة بالمليمترات}}$$

٢- حاول قياس أي تركيب في الصورة المجهرية بالمليمترات واضرب هذا الرقم بالعامل العشري المذكور سابقاً. وهذا سوف يعطيك حجم التركيب بالمايكرومترات.

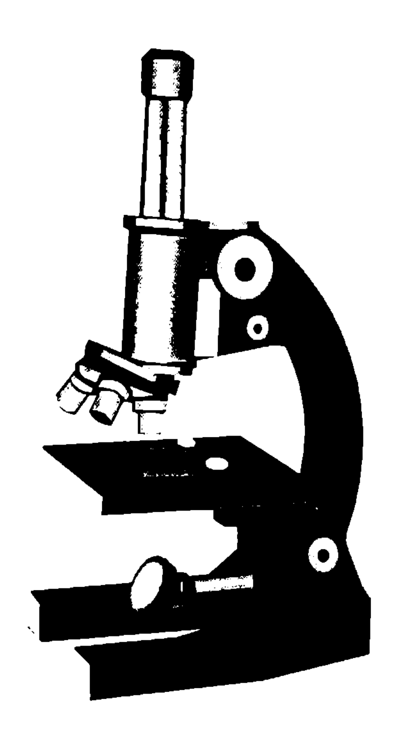
مثال: أ- طول مقياس الدلالة = ١٠ ملم

$$\text{العامل العشري} = \frac{\text{١ مايكرومتر}}{١٠} = ٠,١٠$$

ب- طول المايتوكوندريون (بالملم) مقاسة في الصورة = ١٤ ملم

١٤ ملم × ٠,١٠ = ١,٤ مايكرومتر طول المايتوكوندريون

حاول قياس حجم بعض الخلايا والنوى والمايتوكوندريا في الصورة المجهرية باستعمال مقياس الدلالة في الشكل – ٣٠.



المختبر الخامس

تكـــاثر الخليـــة

Cellular Reproduction

تنقسم نوى الخلايا في حالتي الانقسام الاعتيادي mitosis والانقسام الاختزالي meiosis. ففي الانقسام الاعتيادي تكون النوى الوليدة الناتجة مماثلة لبعضها البعض ومماثلة للنواة الأصلية parental nucleus من حيث عدد الكروموسومات والتكوين الوراثي. أما في حالة الانقسام الاختزالي فتتكون أربع نوى وليدة daughter nuclei تحتوي كل واحدة منها على نصف عدد الكروموسومات الموجود في النواة الأصلية وتحتوي أيضاً على تكوين وراثي تختلف عن النواة الأصلية. ويعد الانقسام الاختزالي جزءً مهماً من دورة الحياة الجنسية حيث تكون النوى الوليدة موجودة في خلايا ستتخصص إلى نطف sperm وبيوض eggs.

أ- دورة الخلية The Cell Cycle:

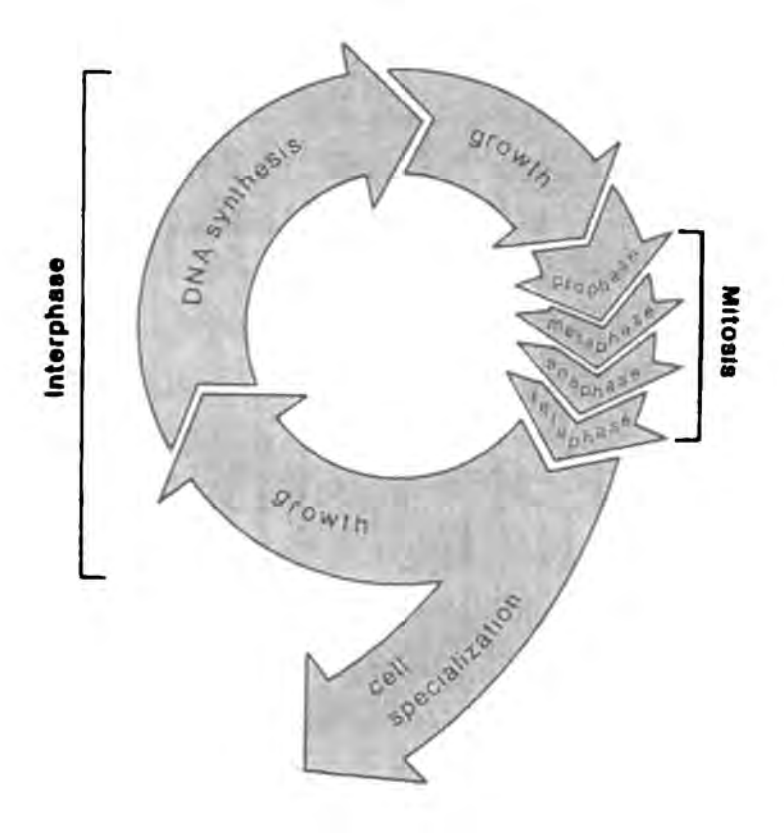
تمثل دورة الخلية سلسلة الأحداث المعقدة خلال فترة حياة الخلية المنقسمة بشكل فعال، حيث تتألف هذه الدورة من طورين هما: طور الانقسام الاعتيادي M-phase (يشير الحرف M إلى كلمة mitosis) الذي تنقسم خلاله النواة والخلية، والطور البيني interphase (الشكل -٣٢). ويقسم طور الانقسام الاعتيادي (الطور M) إلى أربع مراحل متميزة هي: الطور التمهيدي prophase والطور الاستوائي metaphase والطور الانفصالي anaphase والطور النهائي telophase. وفي أثناء الطور البيني يحدث تناسخ replication (تضاعف duplication) وتخليق للحامض النووي DNA وكذلك تخليق الحامض النووي RNA ومعظم البروتينات الأساسية للانقسام الاعتيادي. ويلاحظ من الشكل -٣٢ بأن تناسخ DNA وتخليق الهستونات histones (البروتينات المرتبطة بجزيئة DNA) يحدث فقط في أثناء فترة من الطور البيني تدعى فترة التخليق S phase (يشير الحرف S إلى كلمة تخليق synthesis). ويهدف تضاعف DNA في أثناء طور التخليق إلى توفير DNA للخلايا الوليدة الناتجة عن الانقسام الاعتيادي اللاحق. ويقع ضمن الطور البيني أيضاً طورين آخرين هما طوري الفجوة G phases (يشير الحرف G إلى كلمة فجوة gap). إن الفجوة G1 (G1 gap) تسبق عملية تناسخ DNA. وتمثل الفجوة G1 الفترة الواقعة بين نهاية الانقسام الاعتيادي mitosis وبداية طور التخليق S-phase للانقسام اللاحق. وفي أثناء G1 قد تتخذ

الخلية مساراً يؤدي بها إلى عملية التمايز differentiation بدلا من استمرارها في دورة الخلية. وفي أثناء الفجوة G2 (G2 gap) تتجمع التراكيب التي تسهم مباشرة في الانقسام الاعتيادي مثل ألياف المغزل spindle fibers.

تحتل عملية الانقسام الاعتيادي ما يقارب ١٠٪ من الوقت الكلي لدورة الخلية إلا أنها تعد مهمة لكي تتميز بين الأقسام المتعددة من الانقسام الاعتيادي. لذا فإن الانقسام النووي المتضمن ترتيب خيوط DNA بشكل كروموسومات وانفصالها يدعى بانقسام النواة karyokinesis. أما انقسام جسم الخلية (أي السايتوبلازم وعضياته) فيدعى بانقسام الخلية cytokinesis. ولا تحدث عملية انقسام الخلية والنواة في وقت واحد. ومع أن أساسيات دورة الخلية هي نفسها في جميع الكائنات الحية إلا أن هناك بعض الاختلافات في هذه الدورة بين الخلايا الحيوانية والنباتية. وأن الهدف من هذا الجزء من المختبر الخامس هو التعرف على الخطوات الأساسية في دورة الخلية وتحديد التشابهات والاختلافات في هذه العملية بين الخلايا النباتية والحيوانية. وأن إكمال الجدول- ١١ سيساعدك في تلخيص هذه التشابهات والاختلافات.

١- دورة الخلية في الخلايا النباتية The Cell Cycle in Plant Cells:

تعد قمة جذر البصل إحدى المواد المستعملة على نطاق واسع في دراسة دورة الخلية وذلك بسهولة الحصول عليها وسهولة تحضير الخلايا المنقسمة، وأن كروموسوماتها تكون كبيرة وقليلة العدد لذا فإن دراستها أسهل من دراسة خلايا الكائنات الحية الأخرى. وتمثل قمم الجذور هذه مناطق الانقسام الفعال للخلية لذا فإن الفرص تكون جيدة في العثور على كل طور من عملية الانقسام في عينة من هذه الأنسجة. ومن السهولة دراسة عملية الانقسام من خلال دراسة العملية بشكل سلسلة من المراحل المنفردة.



شكل- ٣٢ مراحل دورة الخلية cell cycle

الجدول – ١١: التشابهات والاختلافات بين دورة الخلية في الخلايا النباتية والخلايا الحيوانية

الطور	الخلايا النباتية	الخلايا الحيوانية
الطور البيني		
الطور التمهيدي		
الطور الاستوائي		
الطور الانفصالي		
الطور النهائي		

حضر شريحة زجاجية لقمم جذر البصل onion root tips ولاحظ سلسلة من الأشرطة الغامقة على الشريحة (الشكل – ٣٣). ويمثل كل شريط مقطع طولي رقيق جداً خلال قمة جذر البصل. ضع الشريحة الزجاجية على مسرح المجهر وحدد موقع أحد المقاطع تحت عدسة القوة الصغرى. ونظراً لرقة هذه المقاطع فليس من الضروري أن تكون جميعها جيدة لغرض الدراسة. وبعد فحص أولي تحت القوة الصغرى غيّر العدسة نحو القوة الكبرى مع مراعاة الدقة في عدم كسر الشريحة. وتذكر التسلسل الذي توجد به المراحل المختلفة ولكن لا تحاول أن تجد هذه المراحل بشكلها المتسلسل. لذا فعند عثورك على الطور الانفصالي أولاً حاول دراسته قبل الانتقال إلى طور آخر. ونظراً لبقاء الخلايا في الطور البيني والطور التمهيدي فترة أطول من بقية الأطوار لذا فإن فرص وجود معظم الخلايا في الطور البيني والطور التمهيدي ستكون أكثر من بقية الفرص للأطوار الأخرى لذا سيلاحظ القليل من الخلايا في الطور الاستوائي والانفصالي والنهائي.

أ- الطور البيني Interphase:

لقد اعتقد علماء الأحياء في السابق بأن الطور البيني للخلية يمثل طور الراحة أو السكون resting phase، إلا أن الخلية في الطور البيني تكون فعالة في عملية التنفس وتخليق DNA و RNA والبروتين تمهيداً لانقسامها (الشكل- ٣٣).

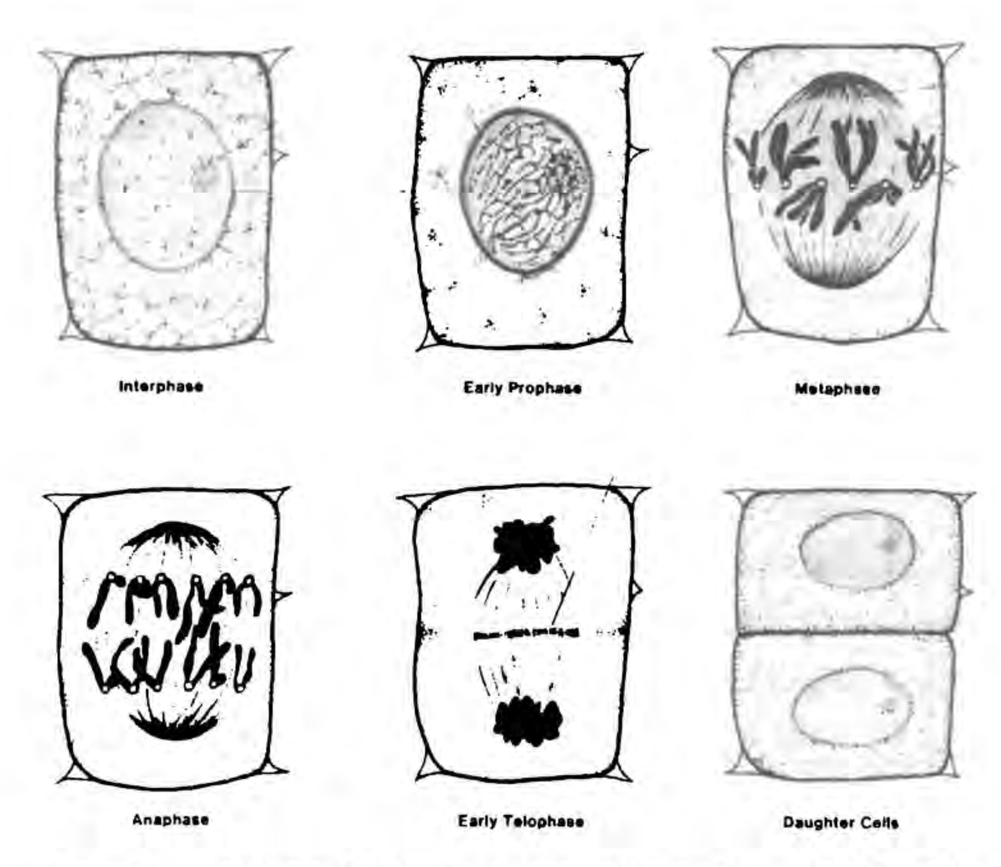
ب- الطور التمهيدي Prophase:

إن خيوط DNA الطويلة والنحيفة تتكثف condensed في أثناء الطور التمهيدي نتيجة لعملية الالتفاف coiling. ويبدأ الغشاء النووي بالتحلل وتتوزع الكروموسومات خلال النيوكليوبلازم nucleoplasm (الشكل -٣٣). وفي أحيان كثيرة تظهر الكروموسومات بشكل كتلة ملتفة في أثناء الطور التمهيدي في قمة جذر البصل. وحتى في هذه المرحلة المبكرة فإن كل كروموسوم قد تضاعف إلا أنه يصعب ملاحظة ذلك في الشريحة. وتحت قوة تكبير عالية يمكن ملاحظة أن كل كروموسوم مكون من خيطين منفصلين يمثلان الكروماتيدات الأخوية sister chromatids. وتكون

هذه الكروماتيدات متماثلة من النواحي التركيبية والكيمياوية والمعلومات الوراثية التي تحملها وذلك لأن أحدهما قد تم تناسخه من DNA الأصلي في أثناء طور التخليق الأخير. وترتبط الكروماتيدات المتماثلة سوية في منطقة ارتباط تدعى السنترومير (الجزء المركزي) centromere. ففي هذه المنطقة يحتوي كل كروماتيد على كنيتوكور kinetochore قرصي الشكل. وتدخل الأنيبيبات الدقيقة microtubules داخل الكنيتوكورات وتخرج منها باتجاه قطبي الخلية. أما بقية الأنيبيبات الدقيقة القطبية polar microtubules فتترتب بشكل ألياف المغزل spindle fibers.

جـ- الطور الاستوائي Metaphase:

في بداية الطور الاستوائي تنفصل بعض الأنيبيبات الدقيقة القطبية وتتكون ارتباطات جديدة بين أُنيبيبات الكنيتوكور الدقيقة وأنيبيبات القطب الآخر. وهذا سيؤدي إلى ظهور ما يبدو وكأنه حركات كروموسومية بلا هدف والتي توصف بالكروموسومات الراقصة dancing chromosomes. وباستمرارية الطور الاستوائي يحدث انفصال عشوائي وإعادة ارتباط لأنيبيبات الكنيتوكور الدقيقة مع الأنيبيبات الدقيقة القطبية للقطب نفسه أو القطب المقابل إلى أن يرتبط الكنيتوكور الكروماتيد الوليد الآخر مع الأنيبيبات الدقيقة لأحد الأقطاب وكنيتوكور الكورماتيد الوليدة مع الأنيبيبات الدقيقة للقطب الآخر. بعد ذلك تنسحب الأنيبيبات الدقيقة القطبية بطريقة معينة بحيث تصبح الكنيتوكورات واقعة في منطقة تتوسط القطبين. وتدعى هذه المنطقة الواقعة في مركز الخلية باسم صفيحة الطور الاستوائي metaphase plate أو الصفيحة الاستوائية equatorial plate وعند وصول كنيتوكورات جميع الكروموسومات إلى منطقة الصفيحة الاستوائية فإن الخلية تكون عندئذ قد وصلت إلى الطور الاستوائي. وفي هذا الوقت تنقسم السنتروميرات تمهيداً لانفصال الكروماتيدات الوليدة في أثناء المرحلة اللاحقة (الطور الانفصالي).



شكل- ٣٣: الانقسام الخيطي (المباشر) mitosis في الخلايا النباتية (خلايا جذر البصل).

د - الطور الانفصالي Anaphase

تنفصل الكروماتيدات المتماثلة لكل كروموسوم عن بعضها حيث تنسحب بواسطة الأنيبيات الدقيقة إلى الأقطاب المتقابلة للخلية. وحالما تنفصل السنتروميرات عن بعضها تنسحب أذرع الكروموسومات الوليدة بشكل سلبي. لذا يمكن تمييز الطور الانفصالي في خلايا البصل من خلال مجموعتي الكروموسومات الشبيهة بالحرف - V (V- shaped chromosomes) في الأقطاب المتقابلة للخلية. وأن الحافة الحادة للحرف V تتوجه باتجاه قطب المغزل.

قلل الإضاءة من خلال تنظيم حجاب المجهر diaphragm وحاول تحديد موقع أي ألياف للمغزل قريبة من مركز الخلية. وتظهر هذه الألياف بشكل خطوط نحيفة

جداً بين مجموعتي الكروموسومات. وينتهي الطور الانفصالي عند وصول الكروموسومات الجديدة إلى الأقطاب المتقابلة للخلايا.

هـ- الطور النهائي Telophase

تنتهي عملية انقسام النواة karyokinesis في أثناء الطور النهائي وتبدأ عملية انقسام الخلية cytokinesis من خلال إعادة تنظيم محتويات الخليتين الوليدتين الجديدتين. وفي أحوال كثيرة يصعب التمييز بين الطور الانفصالي المتأخر وبداية الطور النهائي في خلايا النباتات. ففي الطور النهائي تبدأ الصفيحة الخلوية cell plate بالتكوّن بشكل خط رقيق عبر مركز الخلية وتمثل هذه الصفيحة إشارة لبدء انقسام الخلية (الشكل -٣٣). وعندما تكتمل الصفيحة الخلوية تقسم الخلية الأصلية original cell إلى خليتين وليدتين daughter cells. وباستمرارية الطور النهائي يعاد تنظيم تكوين النوى وينفتح التفاف الكروموسومات حيث تصبح طويلة ونحيفة، ثم يعاد تكوين الغشاء النووي وتظهر النويات (الشكل -٣٣). وينتهي الانقسام الاعتيادي بتكوين نوى الطور البيني والتي تحتوي كل واحدة منهما على المجموعة الكاملة من الكروموسومات الأُحادية الخيط single- stranded chromosomes، (الشكل- ٣٣). وتحتوي الخلايا الناتجة عن الانقسام الاعتيادي على العدد والنوع نفسه من الكروموسومات وكذلك التكوين الوراثي للخلية الأصلية.

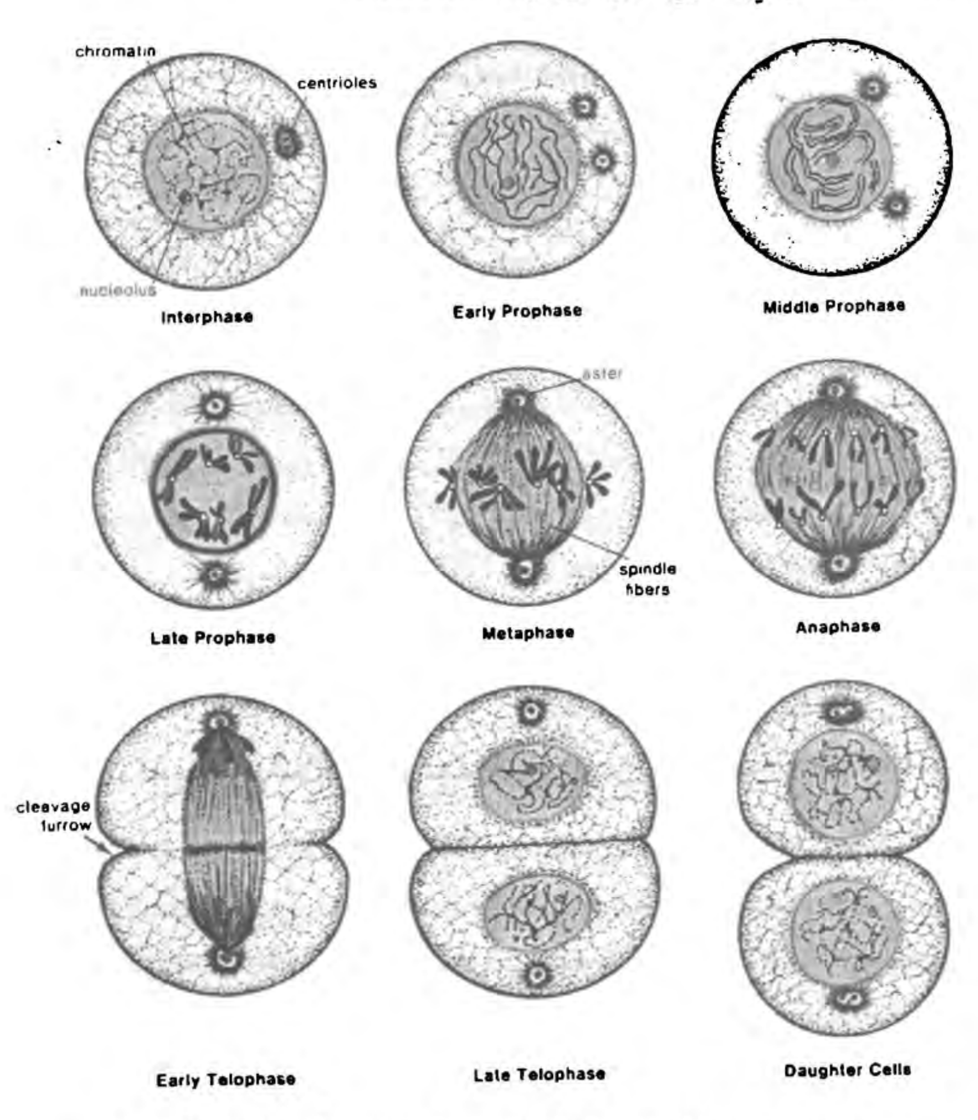
٢- دورة الخلية في الخلايا الحيوانية The Cell Cycle in Animal Cells:

يمكن ملاحظة دورة الخلية في الخلايا الحيوانية بسهولة في شريحة محضرة لبلاستولة السمك الأبيض white fish blastula (تمثل البلاستولة المرحلة المبكرة من التطور الجنيني حيث تتكون نتيجة للانقسامات الخلوية المتعاقبة بعد إخصاب البيضة بالنطفة الذكرية).

حاول الحصول على شريحة لخلايا بلاستولة السمك الأبيض المصبوغة لإظهار المراحل المختلفة لدورة الخلية. وكما هو الحال عند دراستك لشرائح البصل حدد مواقع المراحل المختلفة لانقسام الخلية الحيوانية.

أ- الطور البيني Interphase

تتميز خلايا الطور البيني بنواة واضحة محاطة بغشاء نووي ونوية (الشكل-٣٤). ويلاحظ وجود زوج من العضيات السايتوبلازمية المسماة بالجسيمات المركزية centrosomes والتي تحتوي على المريكزات centrioles.



شكل- ٣٤: الانقسام الخيطي (المباشر) mitosis في الخلايا الحيوانية.

ب- الطور التمهيدي Prophase

على النقيض من الخلايا النباتية يلاحظ في أثناء الطور التمهيدي وجود المريكزات ضمن الجسيم المركزي حيث تتحرك مبتعدة عن بعضها كما لو كانت تتنافر عن بعضها. إذ أنها تتحرك باتجاه الأقطاب المتقابلة للخلية. ويلاحظ تشعع انيبيبات الدقيقة من كل زوج من المريكزات مكونة شكلاً يعرف بالنجمة aster. وعندما يتحلل الغلاف النووي تصبح المنطقة الواقعة بين المريكزات واضحة. وتدعى هذه المنطقة الشفافة نسبياً بالمغزل spindle. وتترتب الأنيبيبات الدقيقة في المغزل لتكوين ألياف المغزل.

جـ- الطور الاستوائي Metaphase

تتحرك الكروموسومات في أثناء الطور الاستوائي باتجاه المنطقة المركزية للمغزل لتكوين صفيحة الطور الاستوائي أو الصفيحة الاستوائية (الشكل – ٣٤). وتستقر الكروموسومات في موقعها من خلال ألياف المغزل المرتبطة بكنيتوكور كل كروموسوم.

د - الطور الانفصالي Anaphase

يبدأ الطور الانفصالي عندما تنفصل أزواج الكورماتيدات عن بعضها وتصبح بشكل كروموسومات وليدة حيث تنسحب هذه الكروموسومات باتجاه قطبي الخلية (الشكل –٣٤). وعندما تصل الكروموسومات إلى قطبي الخلية يكون الطور النهائي قد بدء.

هـ- الطور النهائي Telophase

في أثناء الطور النهائي يختفي المغزل وتظهر النواتين الوليدتين وكذلك النويات، كما وتتكون الأغشية النووية من خلال التحام أجزاء من الشبكة الأندوبلازمية. وفي المرحلة الأخيرة من الطور النهائي يحدث تخصر في السايتوبلازم بين النواتين ويحدث الانقسام الخلوي مما يؤدي إلى تكوين خليتين وليدتين لها المكونات النووية نفسها وكذلك كميات متساوية من السايتوبلازم (الشكل – ٣٤).

ب- الانقسام الاختزالي Meiosis:

تمر الخلايا الجرثومية الأولية primordial germ cells أو غير الناضجة في الانقسام الاختزالي بعملية تنصيف أو اختزال للكروموسومات من العدد الثنائي diploid number إلى العدد الأحادي haploid number وتصبح بشكل أمشاج ناضجة mature gametes. ونتيجة لذلك فإن الانقسام الاختزالي يحافظ على ثبات عدد الكروموسومات، ومن خلاله تحدث تغايرات وراثية بسبب عملية العبور crossing over وبالتالي تبادل الجينات بين الكروموسومات.

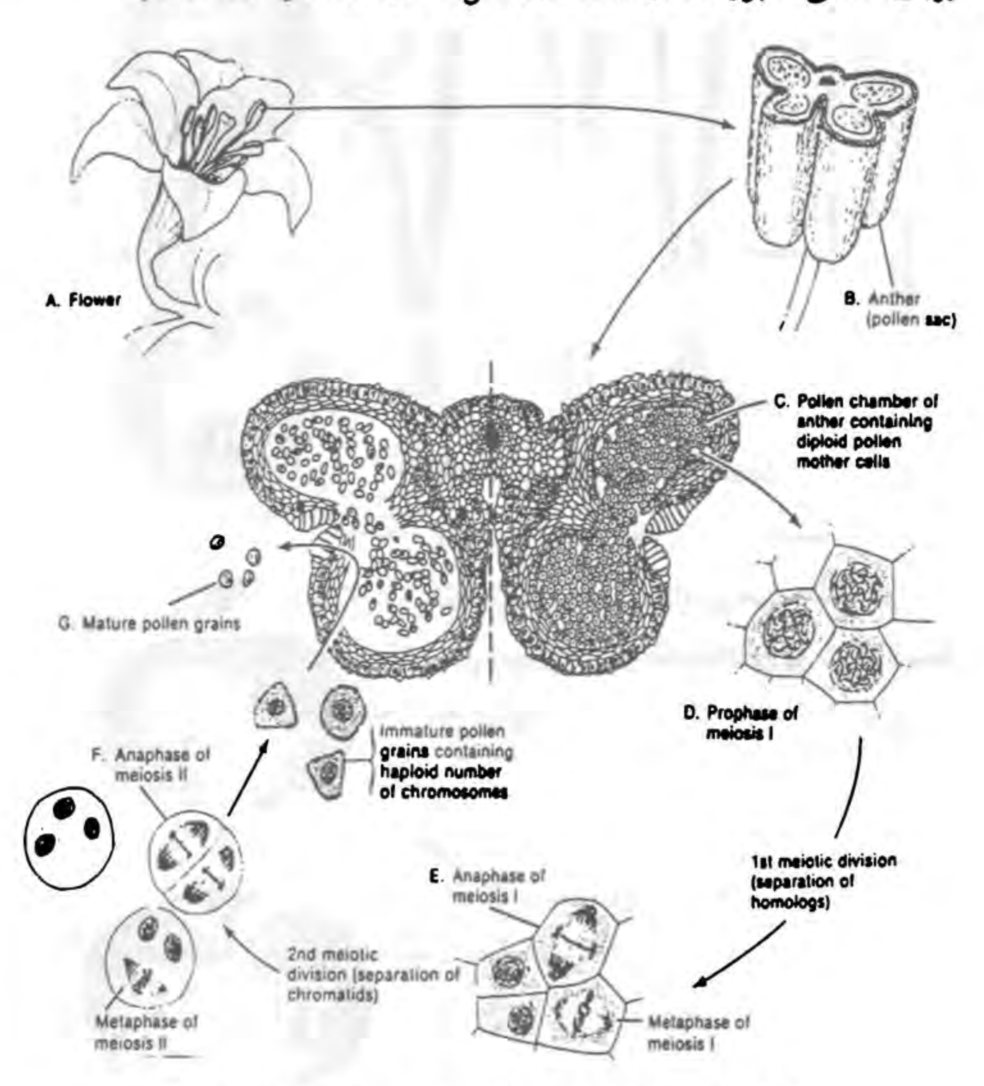
١- الانقسام الاختزالي في نبات الزنبق Meiosis in the Lily:

سيدرس الانقسام الاختزالي كما يحدث عند تطور حبوب اللقاح الناضجة mature pollen grains في النباتات الزهرية flowering plants وتعطي حبوب اللقاح هذه الأمشاج الذكرية male gametes، ويتحد المشيج الذكري مع البيضة لتكوين البيضة المخصبة zygote. وعند فحصك لسلسلة من الشرائح لملاحظة تسلسل الانقسام الاختزالي يمكنك الاستعانة بالشكل- ٣٥ لكي يساعدك في تحديد مواقع المراحل.

أ- الانقسام الاختزالي الأول Meiosis I

افحص زهرة الزنبق وحدد موقع الأسدية anthers أو أكياس اللقاح pollen sacs التي تحتوي على العديد من خلايا اللقاح الأصلية pollen mother cells (الشكل- ٣٥). وتمر هذه الخلايا بعملية الانقسام الاختزالي لتكوين حبوب اللقاح الناضجة. بعد ذلك افحص باستعمال المجهر شرائح لمقاطع عرضية خلال سداة الزنبق الفتية وحدد فيها مواقع خلايا اللقاح الأصلية (الشكل- ٣٥). إذ تحتوي نوى هذه الخلايا على العدد الثنائي diploid number للكروموسومات وأن العديد من خلايا اللقاح الأصلية هذه تكون في الطور التمهيدي للانقسام الاختزالي الأول. وفي أثناء هذا الطور تقرن الكروموسومات المتماثلة homologous chromosomes (كل كروموسوم مؤلف من كروماتيدين) لتكوين الرباعيات tetrads (ارتباط أربع

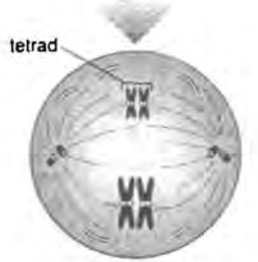
كروماتيدات في الكروموسومات المتماثلة) ويحدث تبادل في المكونـات الوراثيـة بآليـة فيزياوية تدعى العبور crossing over (الشكل- ٣٧). ما أهمية هذه العملية؟



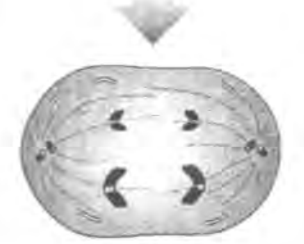
شكل- ٣٥: يمثل الانقسام الاختزالي في المتك Lily anther.



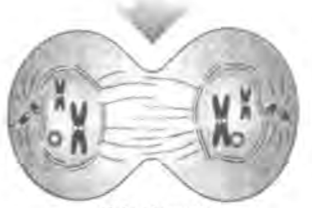
Prophase I



Metaphase I



Anaphase I



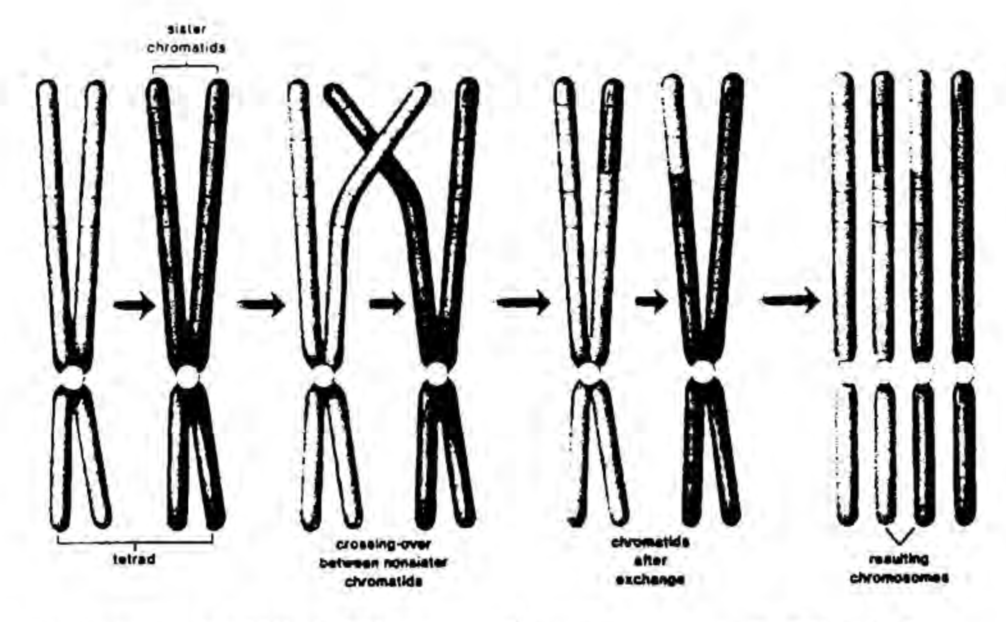
Telophase I



Daughter Cells: Late Interphase

شكل- ٣٦

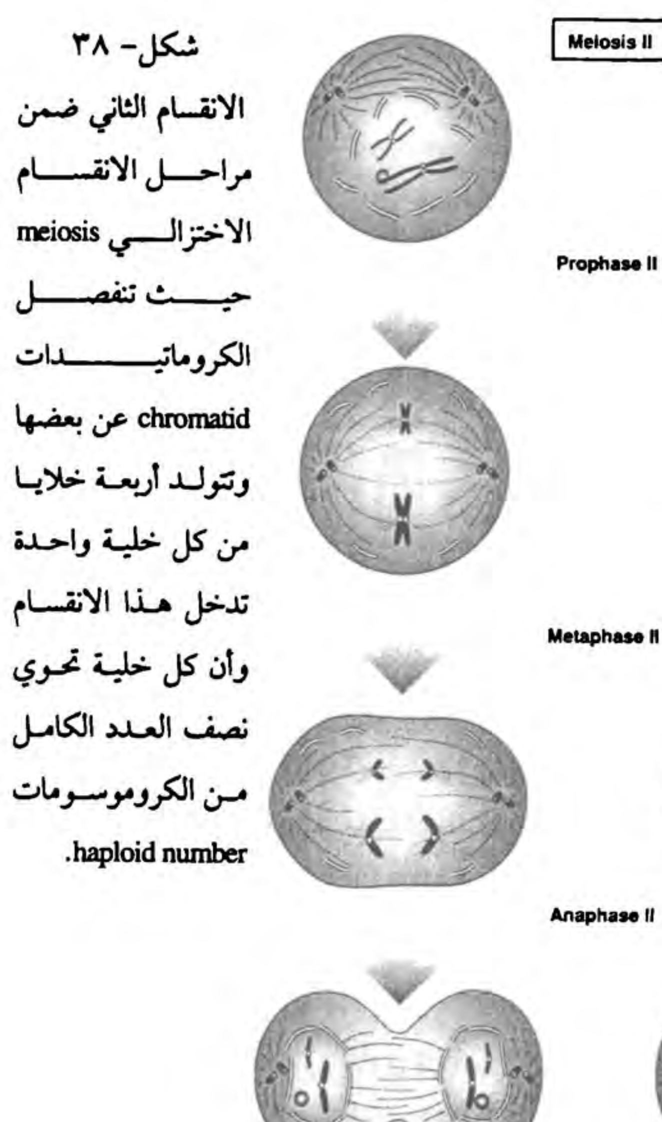
الانقسام الاختزالي Meiosis الأول حيث يحصل خلال مراحل هذه العملية اصطفاف الكروموسومات المتماثلة ثم عبور المادة الوراثية crossing over. وأن الخلايا المتولدة من الانقسام الأول تحوي نصف العدد من الكروموسومات haploid number وأن كل كروموسوم له اثنين من chromatid.

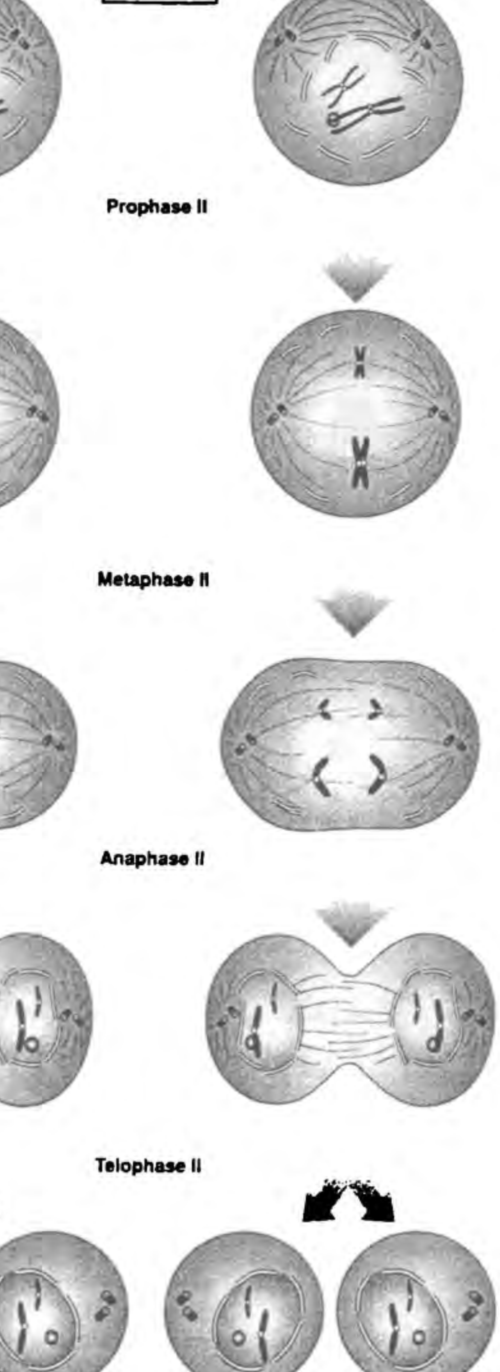


شكل- ٣٧: العبور crossing over أثناء عملية الانقسام الاختزالي meiosis. إن العبور يتلخص في انتقال قطعة من الكروموسوم إلى الكروموسوم المتماثل. وأنه بعد انتهاء العملية فإن الكروموسومات المتماثلة تحمل جينات متباينة.

تنفصل الكروموسومات المتماثلة في أثناء الطور الانفصالي بحيث يتجه كل كروموسوم إلى أحد قطبي الخلية. ونظراً لكون هذه العملية تمثل انفصال أزواج الكروموسومات وليس الكروماتيدات، لذا فإن محتوى الخلايا من الكروموسومات عند نهاية الانقسام الاختزالي الأول قد أختزل من الحالة الثنائية diploid إلى الأحادية haploid.

افحص شرائح لسداة الزنبق تُظهر انفصال الكروموسومات المتماثلة (الشكل-٣٥). وأن العدد الثنائي للكروموسومات في الزنبق هو ٢٤. ما هو عدد الكروموسومات في الخلايا المتكونة بعد الانقسام الاختزالي الأول؟





شكل- ٣٨
الانقسام الثاني ضمن مراحل الانقسام الاختزالي meiosis حيث تنفصل الكروماتيدات chromatid عن بعضها وتتولد أربعة خلايا من كل خلية واحدة تدخل هذا الانقسام وأن كل خلية تحوي نصف العدد الكامل من الكروموسومات haploid number.

ب- الانقسام الاختزالي الثاني Meiosis II

افحص شرائح من الأسدية تبين الخلايا الناتجة من الانقسام الاختزالي الأول وهي في الطور الاستوائي أو الانفصالي أو كلاهما في أثناء الانقسام الاختزالي الثاني (الشكل -٣٥).

ويظهر في هذه الخلايا إن الكروماتيدات المكونة للكروموسومات تنفصل عن بعضها وتتجه نحو قطبي الخلية (الشكل- ٣٨).

وكما هو الحال في الانقسام الاعتيادي فإن الكروماتيدات تنفصل عن بعضها وتدعى بالكروموسومات الوليدة. وعند قطبي الخلية تحاط الكروموسومات الوليدة بغشاء نووي. ويعقب انقسام النواة انقسام الخلية cytokinesis. ما هو عدد حبوب اللقاح المتكونة من الانقسامين الاختزاليين الأول والثاني لخلايا اللقاح الأصلية؟ ما هو العدد الكروموسومي لكل حبة لقاح (N أو 2 N)؟

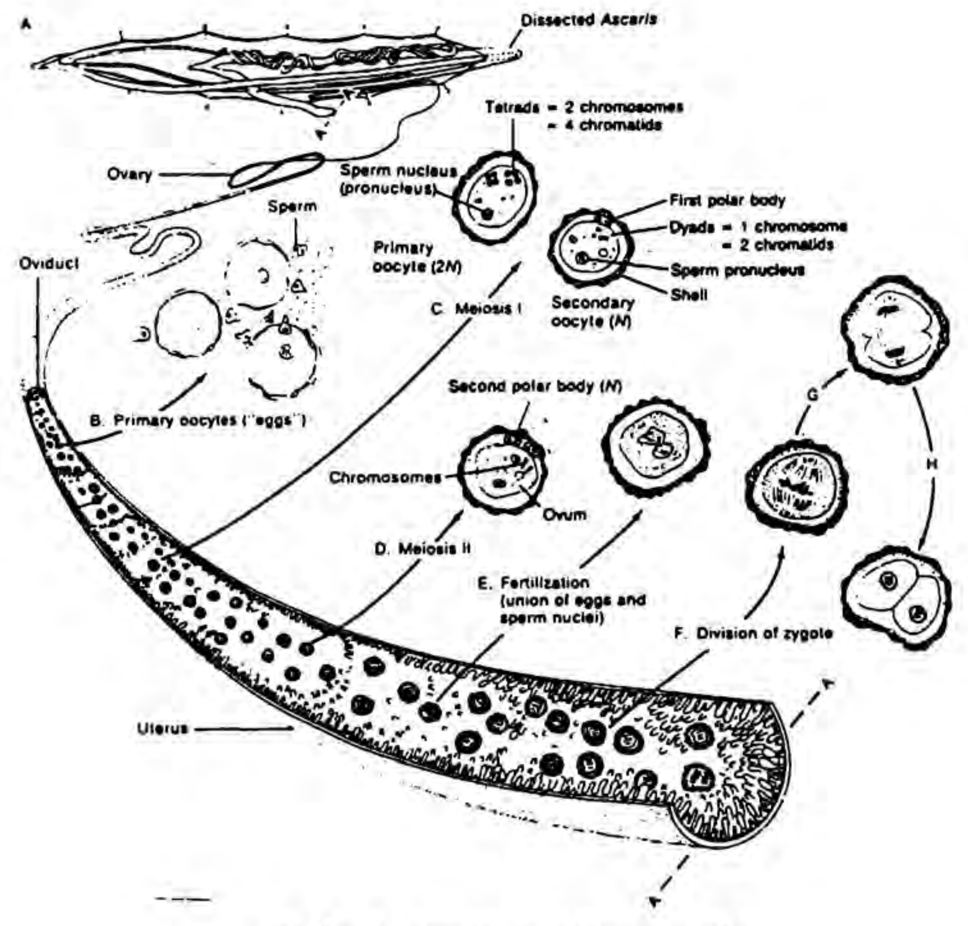
افحص أسدية الزنبق وهي تظهر حبوب اللقاح الناضجة (الشكل- ٣٥).

٢- الانقسام الاختزالي في الأسكارس Meiosis in Ascaris

تتكون الأمشاج gametogenesis في ذكور الحيوانات في الخصى، أما في الإناث فإن الأمشاج تتكون في المبايض ovareis. وفي هذا الجزء من المختبر سيقوم كل طالب بدراسة إحداث الانقسام الاختزالي عند تكوين البيضة oogenesis كما تحدث في دودة الإسكارس الطفيلية.

ونظراً لكون العدد الثنائي للكروموسومات في الإسكارس هو ٤ فقط لذا فإنها تعد نموذجاً مثالياً لدراسة هذه العملية. تتألف الأعضاء التناسلية الأنثوية للإسكارس من زوج من الأنابيب الطويلة الملتفة والمقسمة إلى مناطق هي المبيض ovary وقناة البيض oviduct والرحم uterus (الشكل- ٣٩).

تتكون البيوض في المبايض ثم تنتقل إلى قناتي البيض لإخصابها بالنطف.



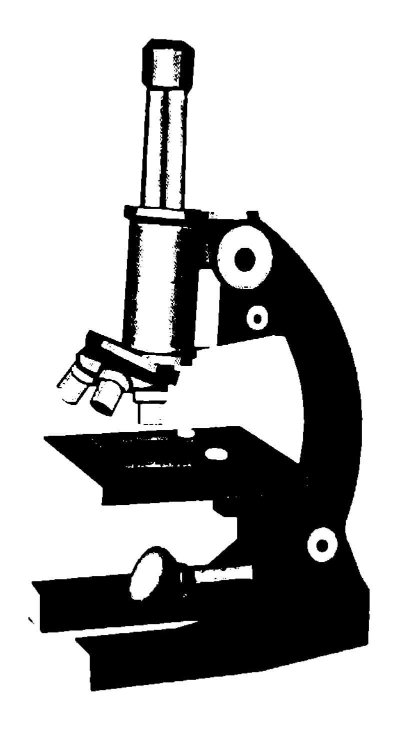
شكل- ٣٩: الانقسام الاختزالي في الأسكارس

افحص شرائح محتوية على قناة البيض والرحم لأنثى الإسكارس. حدد موقع قناة البيض التي تحتوي على أعداد كبيرة من النطف المثلثية الشكل triangular sperms المنتشرة بين البيوض eggs (الشكل- ٣٩). وأن البيوض في هذه المرحلة لا تزال ثنائية العدد من الكروموسومات وذلك لأن عملية تكوين البيضة لا تبدأ إلا بعد اختراق النطفة لها. وأن مصطلح البيضةegg في هذه المرحلة من التطور لا يعد دقيقاً تماماً. وأن المصطلح الأكثر دقة هو خلية البيضة الأولية primary oocyte وهي الخلية التي تمر بعملية الانقسام الاختزالي وتصبح بيضة ناضجة mature egg. وفي الشريحة فإن هناك بعض البيوض التي اخترقتها النطف.

ما هو عدد الكروموسومات الموجودة في خلية البيضة الأولية للإسكارس؟ تتضاعف الكروموسومات المتماثلة في خلية البيضة الأولية بعد الإخصاب بفترة قصيرة لتكوين الكروماتيدات والتي تقترن مع بعضها مكونة الرباعيات tetrads في أثناء الطور التمهيدي للانقسام الاختزالي الأول (الشكل- ٣٩). وقد تحدث في هذه الفترة عملية العبور التي يحدث من خلالها تبادل الأجزاء الوراثية للكروموسومات المتماثلة (الشكل- ٣٧). حدد مواقع خلايا البيضة الأولية التي حدثت فيها عملية الاقتران synapsis. وفي الطور الانفصالي من الانقسام الاختزالي الأول تتحرك أفراد الأزواج المتماثلة من الكروموسومات إلى قطبي الخلية (الشكل- ٣٩). وبما أن السنترومبرات لا تنفصل عن بعضها لذا تبقى الكروماتيدات الأخوية سوية وتدعى بالثنائيات dyads. أما في الطور النهائي من الانقسام الاختزالي الأول فيلاحظ حدوث انقسام غير متساوي للسايتوبلازم. وهذا ما يؤدي إلى تكوين خلية كبيرة تدعى خلية البيضة الثانوية secondary oocyte وخلية صغيرة تدعى الجسم القطبي الأول first polar body (الشكل- ٣٨). ما هو عدد الكروموسومات الموجودة في الجسم القطبي الأول للإسكارس في الشريحة؟ ما هو عدد الكروموسومات الموجودة في خلية البيضة الثانوية؟

بعد الطور البيني يبدأ الانقسام الاختزالي الثاني عندما تصطف الكروموسومات المتماثلة (المنفصلة في أثناء الانقسام الاختزالي الأول) عند خط استواء مغزل الانقسام في الطور الاستوائي للانقسام الاختزالي الثاني (الشكل- ٣٨). ويتألف كل كروموسوم متماثل من كروماتيدين ينفصلان عن بعضهما في أثناء الطور الانفصالي للانقسام الاختزالي الثاني ويتجهان إلى قطبي الخلية. وينتج عن الانقسام الاختزالي الثاني الجسم القطبي الثاني second polar body وخلية كبيرة تتخصص إلى خلية البيضة egg cell أو البيضة ovum. وإن الجسم القطبي الأول الناتج عن الانقسام الاختزالي الأول قد يدخل أولا يدخل في الانقسام الاختزالي الثاني. لذا فإن الخلية ذات العدد الثنائي من الكروموسومات والموجودة في مبيض الأسكارس تمر بعملية الانقسام الاختزالي مؤدية إلى تكوين بيضة واحدة فقط، وأن الأجسام القطبية تكون غير فعالة. إن الانقسام الخلوي غير المتساوي في أثناء عملية تكوين البيضة هو

لضمان وصول كمية كبيرة من السايتوبلازم والغذاء المخزون إلى البيضة ovum غير المتحركة لغرض استعماله من قبل الجنين النامي. وإن خلية النطفة المتحركة تسهم فقط في إعطاء المادة الوراثية. وفي أثناء نضج البيضة تبقى نواة النطفة (النواة الأولية pronucleus) غير فعالة في سايتوبلازم البيضة. وبعد الانقسام الاختزالي الثاني تتحد النواة الأولية للنطفة مع البيضة بعملية الإخصاب fertilization لتكوين البيضة المخصبة zygote. حدد في الشريحة الزجاجية البيوض التي تحتوي على نواة النطفة ونواة البيضة وكذلك البيوض التي اتحدت فيها هذه النوى (الشكل- ٣٨). ما هو عدد الكروموسومات الموجودة في البيضة المخصبة؟ وإذا كنت لا تعرف العدد الحقيقي للكروموسومات في البيضة المخصبة، كيف تصف محتوى هذه الخلية من الكروموسومات؟ تنقسم البيضة المخصبة ونواتها في الرحم لتكوين خليتين، ثم تنقسم كل خلية إلى أن يتكون جنين متعدد الخلايا (الشكل- ٣٨). ما هو نوع الانقسام؟



المختبر السادس

حركة المواد خلال الأغشية البلازمية

Movements of Materials through Plasma Membranes

لكي يقوم الجسم بوظائفه المختلفة لابد له من أن يحافظ على ثبات البيئة الداخلية ضمن حدود معينة وهذا ما يدعى بالاتزان البدني homeostasis. وأن إحدى الآليات التي يتم من خلالها الاتزان البدني هي تنظيم الأغشية البلازمية لحركة المواد من الخلية وإليها. وإن المواد المختلفة لا تخترق الأغشية البلازمية بدرجة متساوية لذا يعد الغشاء اختياري النضوحية. وإن الوسط الخارجي والداخلي للخلية هو عبارة عن محلول مائي لأيونات وجزيئات عضوية ولا عضوية ذائبة. وتتم حركة هذه الجزيئات والأيونات في هذه المحاليل عبر الأغشية البلازمية بعملية الانتشار diffusion والتي هي عبارة عن عملية فيزياوية تؤدي فيها الطاقة الحركية للجزيئات والأيونات إلى حركتها من مناطق التركيز العالي إلى مناطق التركيز الواطيء لحين إشغالها الحيز المتاح لها. فالغاز الذي يتحرر في غرفة يتوزع بشكل متجانس في نهاية الأمر. وعند إذابة بلورة من ملح كلوريد الصوديوم في قدح ماء فإن أيونات الصوديوم والكلوريد ستتوزع بشكل متجانس خلال الماء. ويدعى هذا النوع من الانتشار بالانتشار السلبي passive diffusion والذي يحدث نتيجة للحركة العشوائية لجزيئات المذاب (الملح) solute والمذيب solvent دون الحاجة للطاقة.

يمثل النقل الفعال active transport أحد أنواع الانتشار الذي تتحرك فيه الدقائق الذائبة (الأملاح) عكس التدرج التركيزي concentration gradient وتحتاج العملية إلى الطاقة. والمثال على ذلك احتواء خلايا الدم الحمر في الإنسان على بوتاسيوم أكثر بثلاثين مرة عما هو موجود في بلازما الدم.

أما التناضح (الأوزموزية) osmosis فيمثل انتقال جزيئات الماء خلال غشاء اختياري النضوحية من منطقة التركيز العالي للماء إلى منطقة التركيز الواطيء. ويوضح الشكل- ٤٠ هذه الظاهرة.

تحدث عملية الانتشار والتناضح نتيجة للفاعلية الحركية للجزيئات أو الأيونات، وتتأثر هاتين العمليتين بعدد من العوامل الأخرى مثل درجة الحرارة والوزن الجزيئي للمادة المنتشرة وذوبان الملح في الدهون. وفي هذه الدراسة سيتم التعرف على الانتشار والتناضح وبعض العوامل المنظمة لهاتين العمليتين.

أ- ملاحظة عملية الانتشار Observing Diffusion:

ستلاحظ في هذا الجزء من المختبر أنواع الانتشار المختلفة وسوف تدرس تأثير العوامل المتنوعة على معدل انتشار الدقائق.

١- انتشار غاز في غاز Diffusion of a Gas in a Gas :

توضح حركة الغازات في الهواء عملية الانتشار. ولتوضيح هذه العملية يستعمل الجهاز الموضح في الشكل – ٤١. خذ قطعة من القطن المنقوعة بهيدروكسيد الأمونيوم (NH_4OH) وثبتها في إحدى نهايتي الأنبوبة وقطعة أخرى من القطن المنقوعة بحامض الهيدروكلوريك وثبتها في النهاية الأخرى.

تحذير: تعد المواد الكيمياوية هذه أكالة corrosive لذا يجب استعمال كفوف مطاطية عند التعامل معها. ويجب فتح قنينة مادة كيمياوية واحدة فقط عند وقت الاستعمال.

ضع قطعتي القطن في نهايتي الأنبوبة الزجاجية في وقت واحد كما في الشكل-٤١. لماذا توضع في وقت واحد؟

يتفاعل هيدروكسيد الأمونيوم مع حامض الهيدروكلوريك لتكوين كلوريد الأمونيوم NH_4Cl (راسب ضبابي أبيض) والماء كما في المعادلة الآتية:

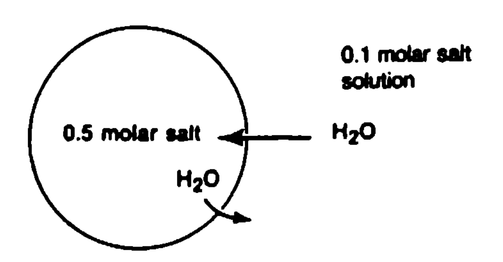
$$NH_4OH + HCl \longrightarrow NH_4Cl + H_2O$$

إن الوزن الجزيئي لأيون الأمونيوم هو ١٨ ولأيون الكلور هو ٣٥,٥. في أي نهاية من الأنبوبة تتوقع أن يتكون الراسب؟

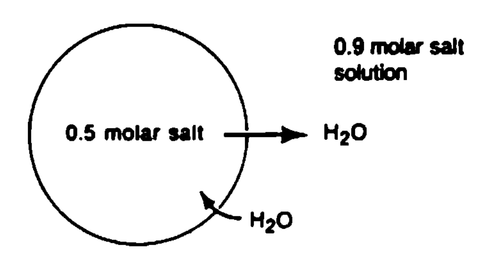
صف ما يحدث عند تقابل هذين الغازين في الأنبوبة.

ما هي العلاقة (إذا كانت موجودة) بين الأوزان الجزيئية لهذه الغازات ومعدلات انتشارها؟

تحذير: تخلص من قطع القطن المشبعة بالمواد الكيمياوية بوضع كل قطعة في قدح من الماء.

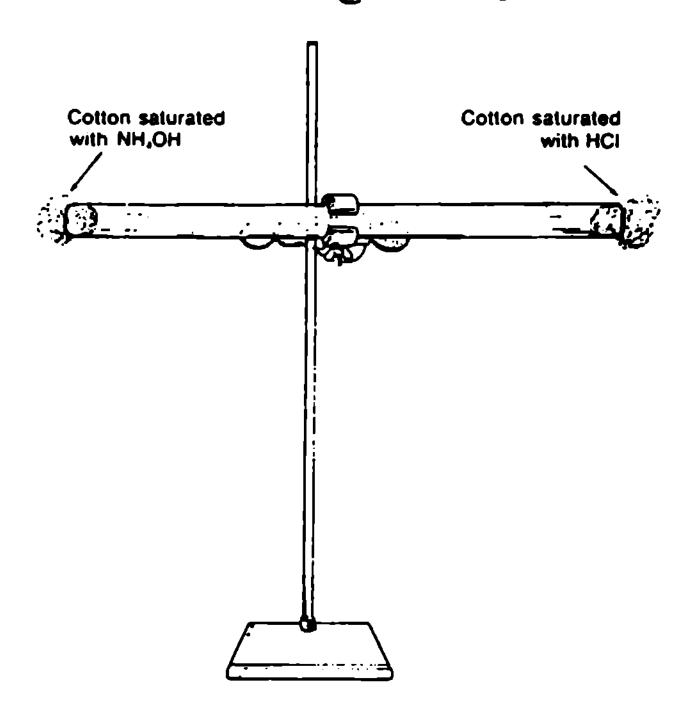


A. More water enters cell than leaves.



B. More water leaves cell than enters.

شكل- ٤٠: يوضح عملية osmosis.



شكل- ٤١: جهاز لدراسة انتشار الغازات gas diffusion.

٢- انتشار مادة سائلة في مادة صلبة

Diffusion of a Liquid in a Solid

ستستعمل في هذه التجربة طريقة تدعى بالانتشار المناعي المزدوج double immunodiffusion أو تقنية أوكترلوني Ouchterlony technique لدراسة تأثير الوزن الجزيئي على الانتشار. وإن هذه الطريقة محورة عن تقنية بسيطة تستعمل لتحديد العلاقات المعقدة بين المستضدات (الانتيجينات) antigens (المواد المسببة للاستجابة المناعية) والأجسام المضادة antibodies (جزيئات بروتينية خاصة يكونها الجسم نتيجة لتعرضه للمستضد). وإن لهذه التقنية تطبيقات سريرية واسعة بالرغم من استبدالها بطرق أكثر حساسية.

تتضمن الطريقة سكب الأكار agar (مادة هلامية يتم الحصول عليها من بعض الطحالب البحرية seaweeds) في طبق بتري petri dish وتركه لكي يتصلب، بعدها يتم عمل حفر دائرية circular wells في المادة الهلامية قريبة من بعضها البعض. ثم تضاف المواد السائلة المراد دراستها إلى هذه الحفر وتركها تنتشر نحو الخارج حيث تتقابل مع بعضها وتتفاعل مكونة صفاً من الراسب Line of precipitate .

إن المدرس سيعطي كل طالب طبق بتري نبيذ disposable يحتوي على الأكار الشكل-٤٢. وباستعمال ثاقبة الفلين رقم ٥ (No.5.cork borer) اعمل أربع حفر في الأكار كما في الشكل-٤٢.

ملاحظة: يمكنك وضع طبق بتري على الشكل-٤٢ لتحديد وعمل الحفر بشكل دقيق.

املأ كل حفرة بشكل متجانس بكمية قليلة من محاليل (1N: واحد عياري) كلوريد الصوديوم ($NaCl$) وبروميد البوتاسيوم (KBr) وفيريسيانيد البوتاسيوم [$K_3Fe(CN)_6$] ونترات الفضة ($AgNO_3$). وإن الأوزان الجزيئية لكل أيون سالب يتكون عند وضع هذه الجزيئات في المحلول ستكون كما يأتي: أيون الكلوريد (Cl^-)،٣٥؛ أيون البروميد (Br^-)، ٨٠؛ أيون الفيريسيانيد [$Fe(CN)_6^-$] ٢١٢؛ أيون النترات (NO_3^-) ٦٢. افحص طبق بتري على فترات وسجل ملاحظاتك في الشكل- ٤٣. ماذا يمكنك الاستنتاج من هذه الدراسة حول العلاقة بين معدل الانتشار والوزن الجزيئي؟

ب- الدَّيْلَزة Dialysis:

إن الديلزة هي عملية انتشار خلال غشاء اختياري النضوحية يفصل جزيئات أو أيونات صغيرة عن جزيئات أو أيونات كبيرة. ويستعمل مبدأ الديلزة في أجهزة الكلية الاصطناعية artificial kidney machines حيث يتم إمرار دم المريض خلال أنبوب مكوّن من غشاء الديلزة.

ويعمل هذا الغشاء بدلاً عن الكلية التالفة أو المصابة بخلل. فعندما يمر الدم خلال الأنبوب الغشائي membranous tube تنتقل نواتج الفضلات الصغيرة الدقائق (اليوريا والكبريتات) بعملية الانتشار في الدم إلى المحلول المحيط بغشاء الديلزة. بعدها يعاد الدم الذي تمت تصفيته إلى الجسم.

وفي هذه الدراسة سوف تتعرف على مفهوم الديلزة من خلال إزالة أيونات الكلوريد من محلول النشا starch وكلوريد الصوديوم.

وللكشف عن وجود أيونات الكلوريد في المحلول يجب عليك التعرف على الاختبارات البسيطة المستعملة في تشخيص أيونات الكلوريد والنشا.

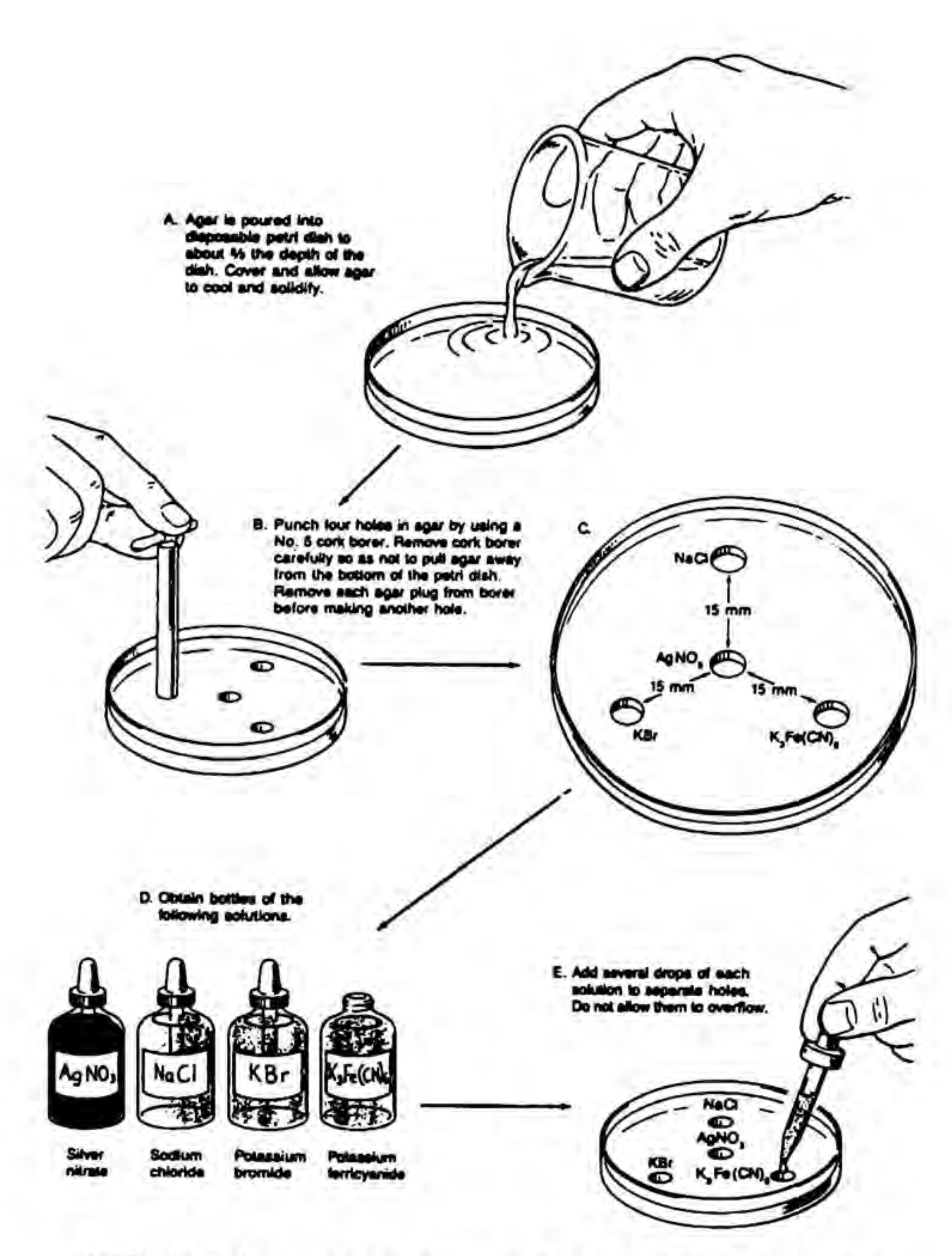
١ - اختبارات ايونات الكلوريد والنشا

(١) املأ أنابيب اختبار مرقمة بـ (٥) مل بمحلول ما أو آخر أو ماء وكما موضح في الشكل- ٤٤.

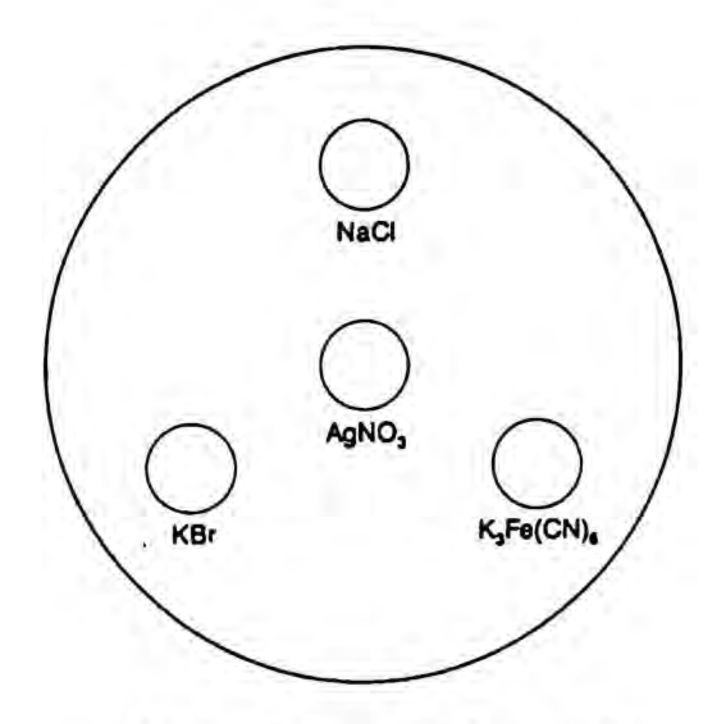
(٢) أضف ٣ قطرات في نترات الفضة ($AgNO_3$) إلى الأنابيب ١، ٣، ٥.

(٣) أضف ٣ قطرات من محلول اليود iodine solution إلى الأنابيب ٢، ٤، ٦.

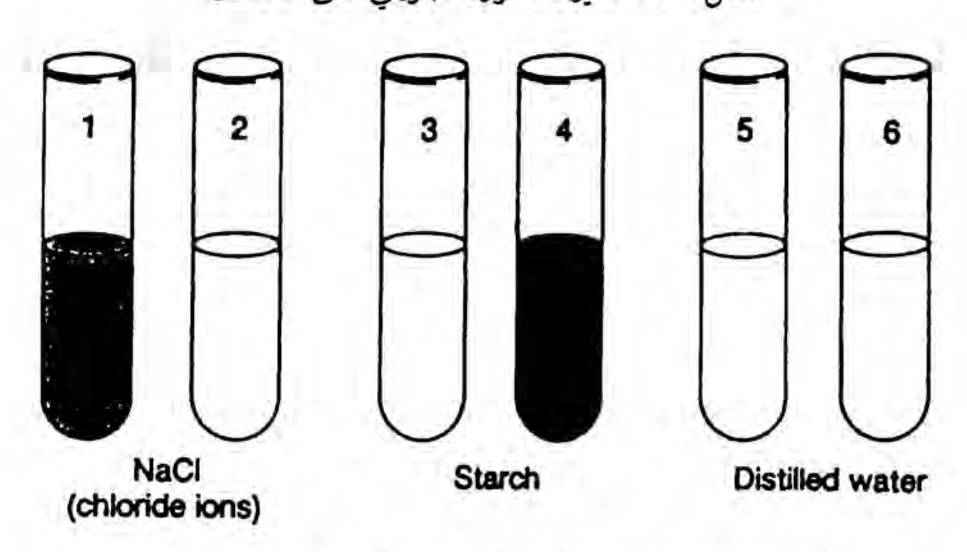
(٤) امزج محتويات كل أنبوبة بعملية التدوير swirling وسجل ملاحظاتك في الجدول- ١٢.



شكل- ٤٢ : طريقة تعيين تأثير الوزن الجزيئي molecular weight على الانتشار



شكل- ٤٣: تأثيرات الوزن الجزيئي على الانتشار



شكل-٤٤: اختبارات خاصة بأيونات الكلوريد وجزيئات النشا.

الجدول- ١٢: اختبار لأيونات الكلوريد والنشا

محلول الاختبار	الكاشف/ الملاحظات	
	نترات الفضة	اليود
كلوريد الصوديوم (أيونات الكلوريد)		
النشا		
الماء المقطر		
الملاحظات:		

٢ - **ديلزة مزيج النشا وكلوريد الصوديوم**

باتباع الطريقة المذكورة في الشكل- ٤٥، املأ غشاء الديلزة بـ (١٥) مل من محلول النشا وكلوريد الصوديوم. اغلق كيس الديلزة كما في الشكل وضعه في قدح يحتوي على ٢٥٠ مل من الماء المقطر. لماذا لا يستعمل ماء الحنفية tap water؟

كيف يمكنك تحديد فيما إذا كان كلوريد الصوديوم أو النشا هو الذي انتشر خلال الغشاء إلى الماء المقطر؟

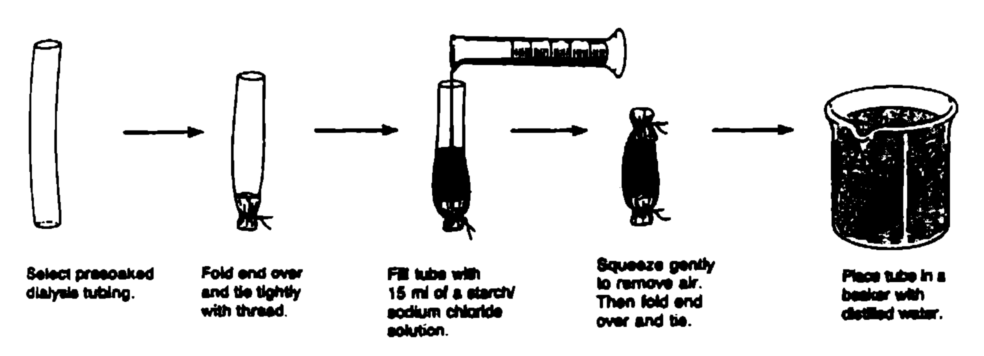
حاول القيام بإنجاز الاختبارات التي حددتها ووضح النتائج التي حصلت عليها.

جـ- التناضح (الأوزموزية) Osmosis:

١ - التحلل الدموي Hemolysis:

يكون غشاء خلايا الدم الحمر erythrocytes ناضحاً للماء وغير ناضح نسبياً للأملاح. لذا فعند وضع خلايا الدم الحمر في محلول ملحي متساوي التوتر isotonic

saline solution (المحلول الذي يكون تركيزه الملحي مساوياً لما موجود في البلازما وسايتوبلازم الخلية الحمراء حيث أنه يكافيء لمحلول كلوريد الصوديوم ذو التركيز ٠,٨٥٪) فإن الخلية في هذا المحلول ستبقى محافظة على شكلها الطبيعي وحجمها. لماذا؟



شكل- ٤٥: طريقة الديلزة dialysis لخليط من ملح الطعام NaCl والنشا.

أما عند وضع خلايا الدم الحمر في محلول منخفض التوتر hypotonic saline solution (المحلول الذي يكون تركيزه الملحي أقل مما هو عليه البلازما أو سايتوبلازم خلية الدم الحمراء) فإن الماء سيدخل إلى الخلايا بمعدل أسرع من خروجه، ونتيجه لذلك تنتفخ خلايا الدم الحمر وتنفجر في النهاية ويتحرر منها الهيموكلوبين. وتدعى هذه الظاهرة بالتحلل الدموي. وعند وضع خلايا الدم الحمر في محلول ملحي زائد التركيز hypertonic saline solution (المحلول الذي يكون تركيزه الملحي أكثر مما هو عليه في البلازما أو سايتوبلازم خلية الدم الحمراء) فإن الخلايا سوف تنكمش shrink وتظهر حدودها بشكل غير منتظم ويقال عن هذه الخلايا بأنها مسننة أو محززة crenated. ولتوضيح التغيرات الحاصلة في خلايا الدم الحمر في هذه الحالات يمكن القيام بالطريقة الآتية:

١- ضع قطرة صغيرة من كلوريد الصوديوم (٠,٨٥٪) على شريحة زجاجية نظيفة.

٢- أضف قطرة صغيرة من دم الأغنام إلى المحلول الملحي الموجود على الشريحة وضع غطاء الشريحة.

٣- افحص خلايا الدم الحمر باستعمال عدسة القوة الكبرى (43X) لجهرك. لاحظ المنطقة التي لا تكون فيها خلايا الدم الحمر بشكل كثيف. ولاحظ أحجام وأشكال هذه الخلايا الطبيعية وارسم بعضاً منها.

٤- أضف قطرتين أو ثلاث قطرات من محلول ملحي زائد التوتر (٥٪ كلوريد الصوديوم) إلى إحدى حافات غطاء الشريحة. لاحظ خلايا الدم الحمر وراقب التغيرات الحاصلة فيها عند وصول المحلول الملحي المركز إليها سجل ملاحظاتك.

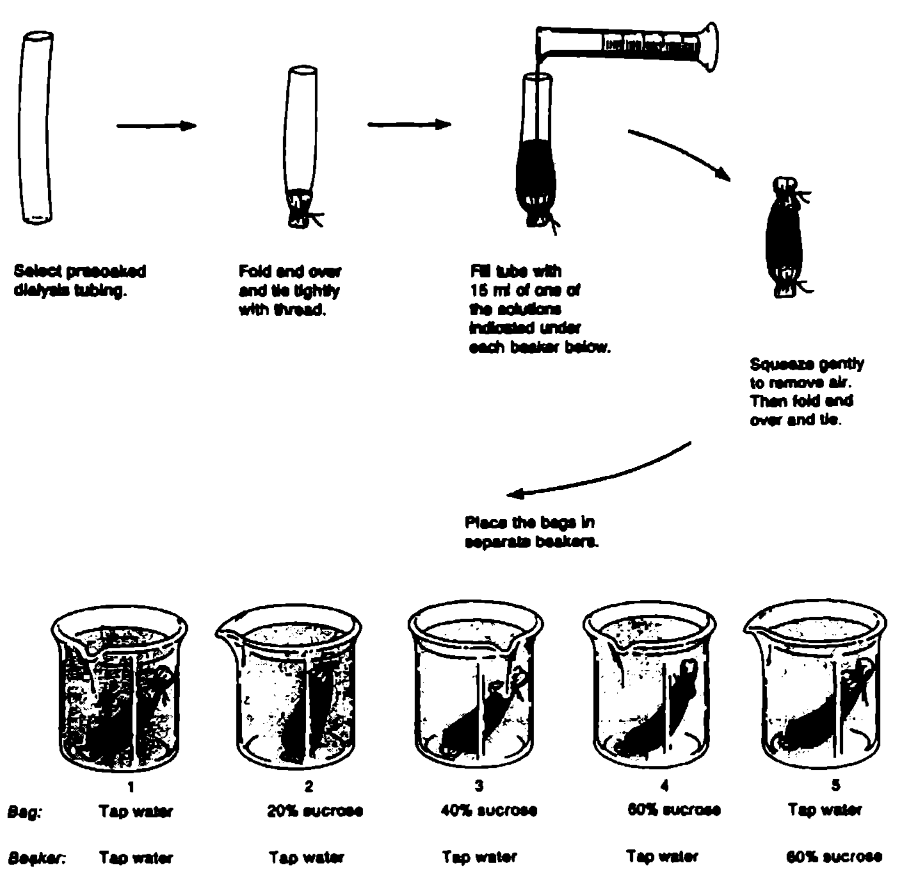
٥- ضع قطرة من الماء المقطر وقطرة من دم الأغنام على شريحة زجاجية. ضع غطاء الشريحة ولاحظ الخلايا في هذا المحلول منخفض التوتر لبضع دقائق. سجل التغيرات التي تلاحظها.

إن معرفة التغيرات الحاصلة في توترية tonicity (تركيز الملح) البلازما أو السوائل النسيجية أو كليهما لها تطبيقات عملية. والمثال على ذلك هو إحدى الأعراض المتعددة لداء السكر diabetes mellitus العطش الشديد extreme thirst الناتج عن نقص في تكوين الأنسولين في البنكرياس. ما هو المسبب لهذا الشعور بالعطش؟ (راجع أي كتاب للفسلجة للإجابة على هذا السؤال).

٢ - تأثير التركيز الملحي على معدل التناضح

تعتمد عملية التناضح (معدل حركة جزيئات الماء من الخلية وإليها) على توترية سايتوبلازم الخلية أو السائل خارج الخلية extracellular fluid وفي هذا الجزء من المختبر سوف يتم استعمال غشاء اصطناعي لدراسة تأثير التغيرات الحاصلة في توترية السائل داخل هذا الغشاء الاختياري النضوحية على عملية التناضح.

١- استعمل خمس أكياس ديلزة dialysis bags والتي سوف تعمل بوصفها أغشية اصطناعية اختيارية النضوحية. أغلق إحدى نهايتي الكيس باستعمال خيط (الشكل- ٤٦) من خلال طي النهاية ولفها بالخيط.



شكل- ٤٦: طريقة قياس معدلات osmosis

٢- املأ الأكياس على النحو الآتي :

الكيس الأول: ١٥ مل من ماء الحنفية.

الكيس الثاني: ١٥ مل من محلول السكروز (٢٠٪)

الكيس الثالث: ١٥ مل من محلول السكروز (٤٠٪)

الكيس الرابع: ١٥ مل من محلول السكروز (٦٠٪)

الكيس الخامس: ١٥ مل من ماء الحنفية

٣- بعد امتلاء كل كيس حاول إزالة الهواء من خلال عصر النهاية السفلى للكيس بلطف لدفع السائل إلى قمة الكيس. اضغط على جانبي الكيس حتى لا يدخل

الهواء مرة أخرى. اطوي نهاية الكيس حوالي ٥ سم واربطها بخيط بشكل محكم. جفف كل كيس من خلال مسحه وسجل وزنه لأقرب ٠,٥ غم. دوّن أوزان الأكياس في الجدول -١٣ عند الزمن صفر.

٤- ضع الأكياس الأول والثاني والثالث والرابع في أقداح منفصلة من الماء. وضع الكيس الخامس في قدح يحتوي على محلول السكروز (٦٠٪).

٥- بعد كل ١٠ دقائق (أي بعد ١٠، ٢٠، ٣٠، ٤٠، ٥٠ دقيقة) اسحب الأكياس من الأقداح وامسحها من الماء وسجل وزن كل كيس على انفراد. سجل المعلومات في الجدول- ١٣. ارسم مخطط بياني يوضح التغيرات الحاصلة في وزن كل كيس (ؤwt، تغير الوزن) بعد كل فترة زمنية. ما هي العلاقة (إذا كانت موجودة) بين تركيز السكروز ومعدل التناضح؟

كيف تفسر الاختلافات الملاحظة؟

الجدول- ١٣: معلومات التناضح

الزمن (دقيقة)	الكيس الأول		الكيس الثاني		الكيس الثالث		الكيس الرابع		الكيس الخامس	
	الوزن	تغير الوزن*	الوزن	تغير الوزن	الوزن	تغير الوزن	الوزن	تغير الوزن	الوزن	تغير الوزن
صفر		صفر		صفر		صفر		صفر		صفر
١٠										
٢٠										
٣٠										
٤٠										
٥٠										

* قد يسجل تغير الوزن بشكل اختلاف موجب (+) أو سالب (-) بين كل قراءة أو بشكل اختلاف قراءة عن الزمن صفر.

٣ - تاثير تاين الجزيئات على التناضح

سيتم في هذا الجزء من المختبر التعرف على التأثيرات التناضحية للإلكتروليتات electrolytes (الجزيئات التي تتأين ionize أو تتفكك dissociate) وغير الإلكتروليتات nonelectrolytes (الجزيئات التي لا تتأين) على خلايا الدم الحمر.

إن المحلول المعلق suspension المخفف لخلايا الدم الحمر يسمح بنفاذ كمية قليلة جداً من الضوء من خلاله لذا فإنه يبدو عكراً turbid.

أما إذا تم تحليل خلايا الدم الحمر فإن المحلول المعلق يصبح شفافاً بحيث يمكن قراءة صفحة كتاب موضوعة خلف الأنبوبة الشفافة بسهولة. وعند الرجوع إلى الجزء الأول من هذا المختبر يلاحظ أن خلايا الدم الحمر تتحلل عند تعريضها لمحلول منخفض أو ناقص التوتر hypotonic solution بالنسبة للخلايا.

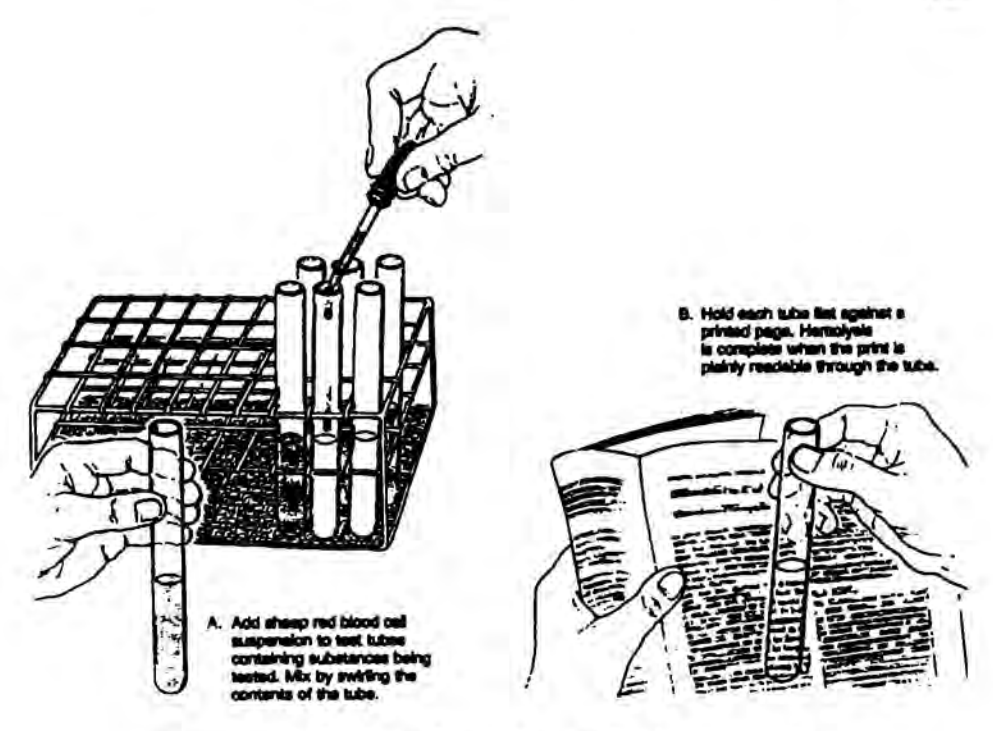
ولهذا السبب يمكنك استعمال المعدل الذي عنده يصبح المحلول المعلق لخلايا الدم الحمر رائقاً clear نتيجة للتحلل الدموي لغرض التعرف على تأثير العوامل المختلفة على معدل عملية التناضح osmosis.

يتناسب التأثير التناضحي osmotic effect الذي يسلطه ملح معين مع تركيز هذا الملح (على أساس عدد الأيونات أو الجزيئات في المحلول). لذا فلا معنى للتعبير عن التركيز الملحي على أساس الكتلة mass (مثلاً ٢٥ غم/ لتر).

وبدلاً من ذلك يتم التعبير عن تركيز المواد غير الإلكتروليتية على أساس الأوزمول osmole الذي هو عبارة عن عدد الدقائق في غرام واحد من الملح غير المتأين. فمثلاً ١٨٠ غم من الكلوكوز تساوي أوزمول واحد من الكلوكوز وذلك لأن الكلوكوز لا يتأين في المحلول.

ومن ناحية أخرى فإن ٥٨,٥ غم من الألكتروليت كلوريد الصوديوم (NaCl) تكافئ أوزمولين (٢ أوزمول) وذلك لأن كلوريد الصوديوم يتفكك إلى أيون الصوديوم وأيون الكلوريد. لذا فإن عدد الدقائق الفعالة تناضحياً أو أوزموزياً في كلوريد الصوديوم ستعادل ضعف الدقائق للكلوكوز غير المتأين (غير المتفكك).

يستعمل المصطلح الأوزمولارية osmolarity لتحديد المحاليل الفعالة تناضحياً. لذا فإن محلول واحد أوزمولار 1 osmolar solution يحتوي على أوزمولار من الكلوكوز يحتوي على ١٨٠ غم من الكلوكوز المذاب في ١٠٠٠ مل من الماء وأن محلول أوزمولار يحتوي على ١٨ غم من الكلوكوز المذاب في ١٠٠٠ مل من الماء.



شكل- ٤٧: طريقة تقدير الوقت الزمني لعملية hemolysis

اعمل الخطوات الآتية:

١- حضّر مجموعتين من أنابيب الاختبار التي تحتوي على محاليل أوزمولارية مختلفة من الكلوكوز وكلوريد الصوديوم وكما في الجدول -١٤.

٢- أضف إلى كل أنبوبة اختبار قطرتين من المحلول المعلق لخلايا الدم الحمر في الأغنام ثم امزج المحتويات بعد الإضافة مباشرة (الشكل-٤٧).

الجدول -١٤: تحديد التراكيز المولارية متساوية التوتر للكلوكوز وكلوريد الصوديوم

محاليل التحلل الدموي ★	الانبوبة ١ $\frac{١}{٤}$ اوزمولار	الانبوبة ٢ $\frac{١}{٦}$ اوزمولار	الانبوبة ٣ $\frac{١}{٨}$ اوزمولار	الانبوبة ٤ $\frac{١}{١٠}$ اوزمولار	الانبوبة ٥ $\frac{١}{١٢}$ اوزمولار	الانبوبة ٦ $\frac{١}{١٤}$ اوزمولار	الانبوبة ٧ $\frac{١}{١٦}$ اوزمولار
كلوكوز							
كلوريد الصوديوم							

★ ضع إشارة × للدلالة على حدوث تحلل دموي

٣- اترك الأنابيب لفترة ٣٠ دقيقة ثم افحص كل أنبوبة لملاحظة التحلل الدموي من خلال وضع صفحة كتاب خلف الأنبوبة. ويكون التحلل الدموي كاملاً إذا كان بالإمكان قراءة صفحة الكتاب من خلال الأنبوبة بشكل واضح.

ملاحظة: يجب وضع حد ثابت لإمكانية قراءة الصفحة بشكل واضح من خلال الأنبوبة المحتوية على المحلول لكي يكون هناك تناسق في إمكانية القراءة.

٤- ضع إشارة × في الجدول – ١٤ للدلالة على حدوث تحلل دموي في أنبوبة واحدة أو أكثر.

٥- حدد الأنبوبة التي تحتوي على التركيز الأوزمولاري الذي يكون متساوي التوتر مع خلايا الدم الحمر. وعند تحديد ذلك افترض بأن الأنبوبة التي تسبق تلك التي حدث فيها التحلل هي التي تعد متساوية التوتر isotonic. هل يعد هذا الافتراض صحيحاً؟ وضح ذلك.

هل أن الأنبوبة التي تم تحديدها هي متساوية التوتر على أساس التركيز؟ وضح ذلك.

هل أن التراكيز الأوزمولارية المتساوية التوتر للكلوكوز وكلوريد الصوديوم هي

نفسها؟ وإذا لم تكن كذلك فما هي تراكيز الكلوكوز وكلوريد الصوديوم التي حددتها على أنها متساوية التوتر؟

الكلوكوز: ــــــــــ كلوريد الصوديوم: ــــــــــ

وضّح الاختلاف في التركيز الأوزمولاري المتساوي التوتر بين الكلوكوز وكلوريد الصوديوم. يمكنك حساب درجة تفكك كلوريد الصوديوم من خلال المعلومات التي حصلت عليها وباستعمال الصيغة الآتية:

$$a = \frac{i}{1 + (k - 1)}$$

حيث أن:

$$i = \frac{\text{التركيز الأوزمولاري المتساوي التوتر للكلوكوز}}{\text{التركيز الأوزمولاري المتساوي التوتر لكلوريد الصوديوم}}$$

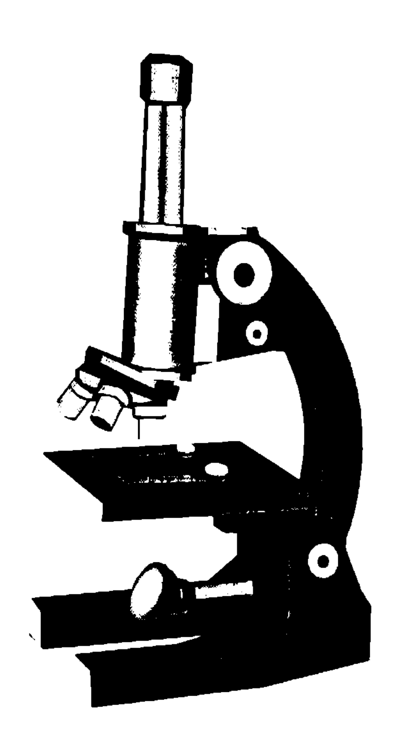
k = عدد الأيونات من كل جزيئة كلوريد الصوديوم

a = درجة التفكك (وللحصول على النسبة المئوية للتفكك يضرب الناتج في ١٠٠).

ما هي النسبة المئوية لتفكك كلوريد الصوديوم في دراستك؟

ما هي النسبة المئوية لتفكك كلوريد الصوديوم التي حصل عليها بقية الطلبة؟

وضح الاختلافات في كمية تفكك كلوريد الصوديوم التي حصل عليها الطلبة الآخرون.



المختبر السابع

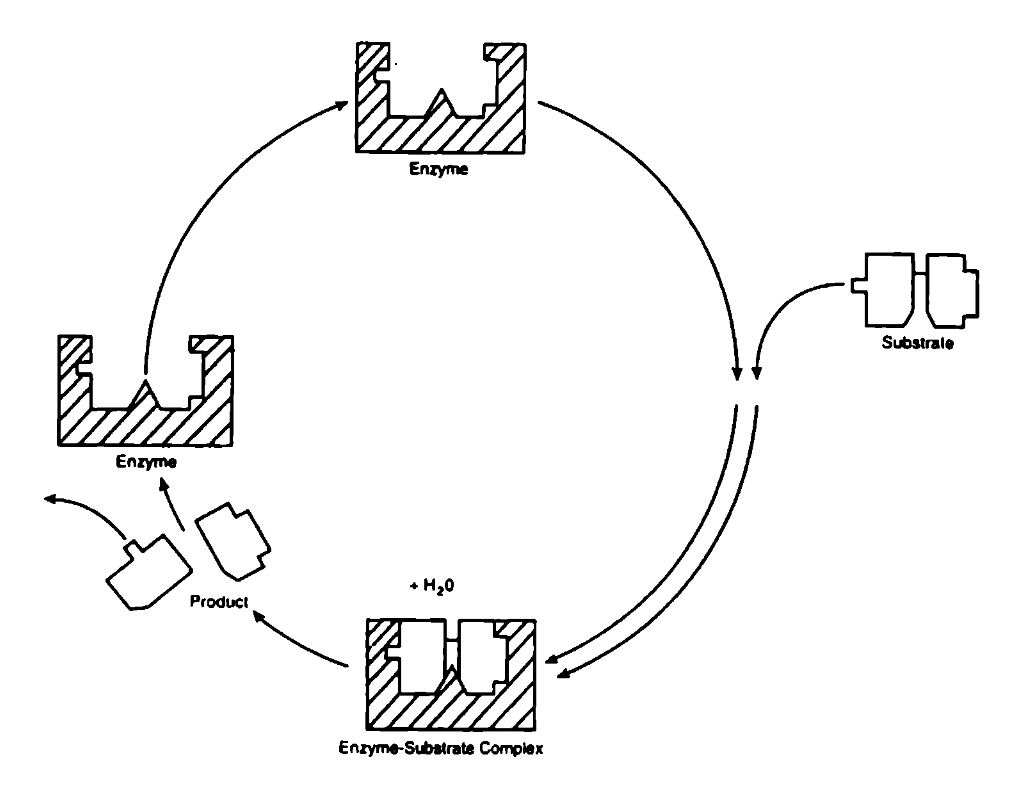
الإنزيمـــــات

Enzymes

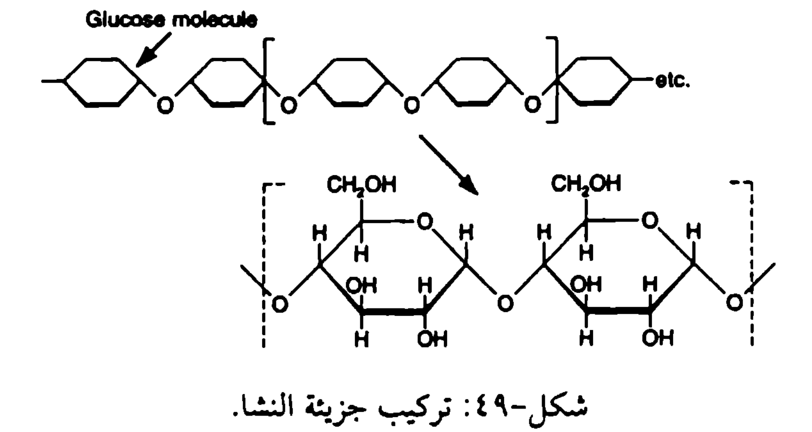
إن العديد من التفاعلات الكيمياوية المميزة لفعاليات الخلية يمكن أن تتم بسرعة في أنبوبة الاختبار عند توفير درجات حرارية وضغوط لا تتناسب والحياة. أما في الكائنات الحية فتتم هذه التفاعلات المعقدة بدرجات حرارية منخفضة نسبياً وبمعدلات دقيقة نتيجة لوجود مواد محفزة عضوية organic catalysts تدعى الإنزيمات. وتعد هذه الأنزيمات عوامل محفزة فعالة، ويتخصص العديد منها بتفاعلات معينة. وأن الأنزيمات لا تغير من اتجاه التفاعل الكيمياوي إلا أنه تعجل منه بصورة متساوية بكل اتجاه. فمثلاً الأنزيم الذي يعجل التحلل المائي لمركب معين له القدرة أيضاً على تعجيل إزالة الماء dehydration للمركب نفسه. وتستلزم الحاجة إلى الأنزيمات بكميات قليلة جداً وذلك لأنها لا تستهلك في التفاعلات التي تحفزها.

يعبر عن فعالية الإنزيمات عادة كمعدل للتفاعل الذي يحفزه الإنزيم. ويعرّف معدل التفاعل على أنه كمية المادة الخاضعة substrate المتحولة أو كمية المادة الناتجة product المتكونة في وحدة الزمن. وأن المادة الخاضعة هي المادة التي تتفاعل معها الإنزيمات. وتدعى دراسة معدلات التفاعلات التي تحفزها الإنزيمات بحركية الإنزيم enzyme kinetics أو علم حركة الإنزيم. وسيتم في هذا المختبر التعرف على بعض العوامل المؤثرة على التفاعلات التي تحفزها الإنزيمات من خلال دراسة إنزيمين هما الأميليز amylase والفوسفوريليز phosphorylase التي تسهم في التحلل المائي للنشا وفي تخليقه.

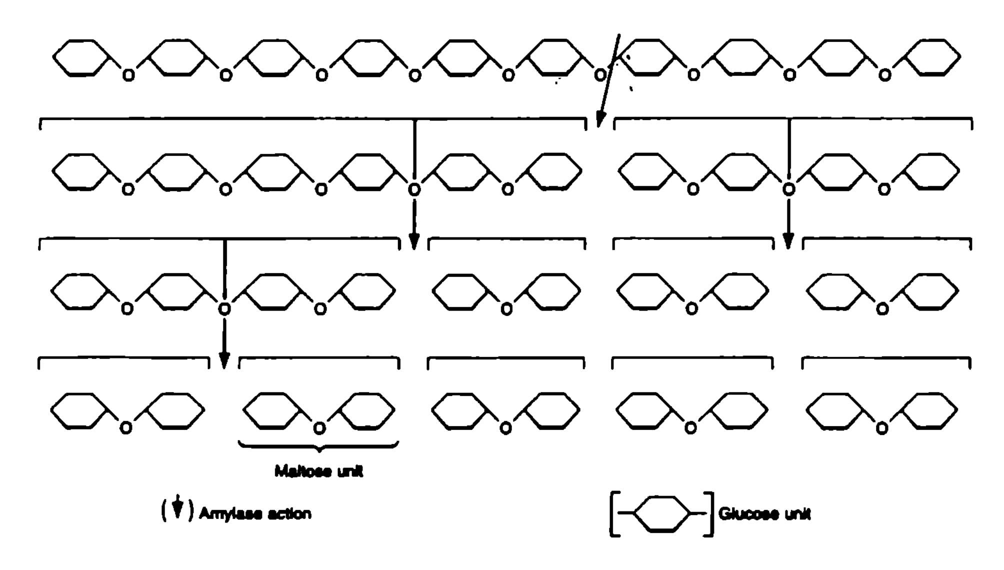
يعد النشا من السكريات المتعددة polysaccharides المؤلفة من جزيئات الكلوكوز المرتبطة مع بعضها كما في الشكل- ٤٩. وتخزن النشويات في العديد من النباتات (في الجذور roots) والحيوانات (في الكبد بشكل كلايكوجين)، لغرض استعماله مصدراً للطاقة. ويتجزأ النشا إلى مكوناته السكرية بعملية التحلل بالماء الإنزيمية enzymatic hydrolysis. ويعد سكر الكلوكوز مهماً لأنه يمثل المركب الأساس في أيض الخلية cellular metabolism، ومما تجدر الإشارة إليه هو أن الكلوكوز يصنع من ثنائي أوكسيد الكاربون والماء بواسطة عملية التركيب الضوئي في النباتات. كما ويحتوي الكلوكوز على الطاقة الموجودة في الأواصر الكيمياوية التي تربط الجزيئة سوية، ويمكن لهذه الطاقة أن تتحرر لإنجاز الفعاليات الحيوية للخلية.



شكل- ٤٨ : تفاعل الأنزيم enzyme مع المادة الخاضعة substrate. يرتبط الأنزيم مع المادة الخاضعة بطريقة القفل والمفتاح مكونة معقد (complex) وبعد ذلك يطلق الناتج product ويرجع الأنزيم إلى دورته مرة ثانية.



شكل-٤٩: تركيب جزيئة النشا.



شكل- ٥٠: يوضح فعالية إنزيم الأميليز amylase الموجودة في اللعاب على النشا.

أ- تحلل النشا بالماء بواسطة الأميليزس

Starch Hydrolysis by Amylases

يتحلل النشا مائياً بواسطة الأميليزس التي هي عبارة عن إنزيمات تعمل على تجزئة النشا إلى وحدات أصغر لحين الحصول على السكر المختزل reducing sugar المسمى بالمالتوز maltose. ويوضح (الشكل-٥٠) تأثير أنزيم المالتيز maltase. ويمكن للكلوكوز أن يدخل في مسار تحليل السكر glycolysis ودورة كريبس Krebs cycle حيث يتجزأ إلى ثنائي أوكسيد الكاربون والماء والطاقة التي تكون بشكل أدينوسين ثلاثي الفوسفات adenosine triphosphate (ATP). وتدعى هذه العملية بالتنفس الخلوي cellular respiration والتي ستتم دراستها في المختبر القادم. وفي التجارب اللاحقة ستقوم بقياس معدل التحلل بالماء للنشا بواسطة إنزيم الأميليز تحت الظروف المختلفة من درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني وتراكيز الإنزيم والمادة الخاضعة وذلك باستعمال المقياس اللوني. كما وستقوم باختبار وجود النشا من خلال إضافة بضع قطرات من اليود إلى العينة. فإذا كان النشا موجوداً فإن لون المحلول سيكون أسود مزرق غامق. وباستمرارية عملية التحلل بالماء تنخفض كمية النشا في العينة تدريجياً. وسينعكس هذا الانخفاض في لون العينة بعد إضافة اليود. وعندما تفحص العينة

بفترات زمنية معينة بعد إضافة الإنزيم سوف تلاحظ تدرج في الألوان من الأزرق العميق deep blue (في حالة وجود النشا) إلى الأحمر (تحلل جزئي بالماء) إلى لون اليود (تحلل كامل بالماء). لذا يمكنك قياس التحلل بالماء للنشا نوعياً qualitatively من خلال ملاحظة التغيرات اللونية. كما ويمكنك قياس التحلل بالماء للنشا كمياً quantitatively من خلال تحديد كمية الضوء التي تمتصها العينة عند وضعها في جهاز مقياس اللون colorimeter. وقبل بدء التجربة يجب عليك القيام بإنجاز الطرق الأولية للحصول على إنزيم الأميليز اللعابي ومعايرة جهاز المقياس اللوني.

تحذير: يجب على كل طالب استعمال اللعاب الخاص به في مثل هذه التجارب. فضلاً عن ذلك يجب على الطالب نفسه القيام بعملية إضافة المواد أو نقلها أو مزجها والخاصة بلعابه. كما يجب على الطالب استخدام ماصات pipets وأنابيب اختبار وانابيب المقياس اللوني النبيذة disposable ثم التخلص منها في أكياس خاصة.

١- اجمع ١٠ مل من اللعاب في أنبوبة اختبار نظيفة. (يمكنك تحفيز إفراز اللعاب من خلال مضغ قطعة من البارافين paraffin). بعدها رشح اللعاب في قدح صغير من خلال طبقة مزدوجة من القماش المستعمل للف الجبن cheesecloth. وهذا يمثل محلول الأنزيم الأصلي stock enzyme solution.

٢- شغّل جهاز المقياس اللوني colorimeter واتركه لمدة ٥ دقائق. ثبت إبرة القياس meter needle لكي تسجل نفاذية صفر٪ عند طول موجي ٥٦٠ نانومتر (nm) بدون وجود أنبوبة اختبار في الحامل holder.

٣- لتهيئة الجهاز حضّر أنبوبة سيطرة لليود iodine control بإضافة ثلاث قطرات من اليود إلى ٣ مل من الماء في أنبوبة المقياس اللوني. ضع أنبوبة سيطرة اليود في جهاز المقياس اللوني ثم اغلق الغطاء ونظّم المسيطر الضوئي إلى أن تسجل الإبرة نفاذية ١٠٠٪. لماذا تستلزم الحاجة لهذه الخطوة؟

١- تأثير تركيز المادة الخاضعة على فعالية الأميليز

سيتم في هذا الجزء من التجربة تحديد تأثير تغيير كمية المادة الخاضعة المتوفرة (النشا) على فعالية الأنزيم.

١- حضر أربع دوارق أيلن ماير Erlenmeyer flasks مرقمة ١-٤ سعة ١٢٥ مل وأضف لكل واحد منها ٥٠ مل ماء مقطر.

٢- أضف ٥٠ مل من محلول النشا إلى الدورق الأول. وأن هذا الدورق يحتوي على ١ : ٢ نشا مخفف.

٣- اعمل تخفيفات أخرى من النشا بنسب ١:٤، ١:٨، ١:١٦ وكما يأتي:

أ ـ خذ ٥٠ مل من محلول النشا المخفف بنسبة ١:٢ في الدورق الأول وضعه في الدورق الثاني. امزج المحتويات لجعل التخفيف ١:٤.

ب ـ خذ ٥٠ مل من الدورق الثاني وضعه في الدورق الثالث ثم امزج المحتويات لجعل التخفيف ١:٨.

جـ ـ خذ ٥٠ مل من الدورق الثالث وضعه في الدورق الرابع ثم امزج المحتويات لجعل التخفيف ١:١٦ . خذ ٥٠ مل من الدورق الرابع وتخلص منها في قنينة يوفرها لك المدرس.

٤- أضف ٠,٢ مل من اللعاب (محلول الأنزيم الأصلي الخاص بك) إلى الدورق الأول، امزج المحتويات ولاحظ الوقت.

٥- بعد مرور دقيقتين أضف ٣ مل من المزيج الموجود في الدورق الأول إلى أنبوبة المقياس اللوني.

٦- أضف ٣ قطرات من اليود iodine إلى الأنبوبة. امزج محتويات الأنبوبة وضع الأنبوبة في جهاز المقياس اللوني. (ملاحظة: تأكد من أن الجهاز قد تمت تهيئته باستخدام سيطرة اليود iodine control قبل تسجيل قراءة الأنبوبة الأولى).

٧- حدد النسبة المئوية للنفاذية transmittance وسجل الرقم في الجدول ١٥.

٨- كرر الخطوات ٥-٧ (باستخدام عينة جديدة) كل دقيقتين إلى أن تستنفذ محتويات الدورق أو أن تصل القراءة إلى نفاذية ٩٠٪. (ملاحظة عندما تصل النفاذية إلى ٩٠٪ أو أكثر فإنها تشير إلى اكتمال التحلل بالماء في مثل هذه التجارب).

٩- كرر الخطوات ٤-٧ بالنسبة للدوارق ٢ و ٣و ٤. واستعمل دورق واحد في كل مرة.

١٠- ارسم مخطط بياني للمعلومات الموجودة في الجدول- ١٥. فسر النتائج على أساس كمية المادة الخاضعة المتوفرة نسبة للكمية الثابتة من الأنزيم.

الجدول-١٥: تأثير تركيز المادة الخاضعة على فعالية الأميليز اللعابي (النسبة المئوية للنفاذية)

الزمن (دقيقة)	تخفيف المادة الخاضعة			
	الدورق الأول (١:٢)	الدورق الثاني (١:٤)	الدورق الثالث (١:٨)	الدورق الرابع (١:١٦)
الاستنتاج				

٢- تأثير تركيز الإنزيم على فعالية الأميليز

١- حضر أربع دوارق أيرلن ماير مرقمة ١- ٤ سعة ١٢٥ مل وأضف ٢٠ مل من الماء المقطر لكل دورق.

٢- أضف ٥ مل من محلول الإنزيم الأصلي إلى الدورق الأول لجعل تخفيف الإنزيم ١:٥.

٣- حضر تخفيفات إنزيمية بنسب ١:٢٥، ١:١٢٥، ١:٦٢٥ وكما يأتي:

أ ـ خذ ٥ مل من الدورق الأول ذو التخفيف الإنزيمي ١:٥ وأضفه إلى الدورق الثاني. ثم امزج المحتويات لجعل تخفيف الإنزيم ١:٢٥.

ب ـ خذ ٥ مل من الدورق الثاني ذو التخفيف ١:٢٥ وأضفه إلى الدورق الثالث لجعل تخفيف الإنزيم ١:١٢٥.

جـ ـ خذ ٥ مل من الدورق الثالث ذو التخفيف ١:١٢٥ وأضفه إلى الدورق الرابع لجعل تخفيف الإنزيم ١:٦٢٥. خذ ٥ مل من محلول هذا الدورق وتخلص منه في قنينة.

٤- أضف ٢٥ مل من محلول النشا إلى الدورق الأول، امزج المحتويات ولاحظ الوقت.

٥- بعد مرور دقيقتين على إضافة النشا، خذ ٣ مل من مزيج الدورق الأول وانقله إلى أنبوبة المقياس الضوئي.

٦- اعمل اختبار للنشا بإضافة ٣ قطرات من اليود.

٧- امزج محتويات الأنبوبة وحدد النسبة المئوية للنفاذية وسجل هذا الرقم في الجدول- ١٦ (ملاحظة: لا تنس تهيئة الجهاز قبل استعمال سيطرة اليود).

٨- كرر الخطوات ٥-٧ كل دقيقتين كما في التجربة السابقة باستعمال عينة جديدة.

٩- كرر الخطوات ٤-٨ للدوارق ٢ و ٣و ٤ مع التذكر العمل بدورق واحد في كل مرة.

١٠- ارسم مخطط بياني للمعلومات.

٣- تأثير الرقم الهيدروجيني على فعالية الأميليز

١- حضّر أربع دوارق أيرلن ماير مرقمة ١- ٤ سعة ١٢٥ مل وأضف إلى كل دورق محلول buffer solution ذو رقم هيدروجيني ٥ و ٦و ٧و ٩.

٢- أضف ٥,٠ مل من المحلول ذو التركيز الأنزيمي المثالي optimum (المحدد في التجربة السابقة) إلى كل دورق.

الجدول- ١٦: تأثير تركيز الإنزيم على فعالية الأميليز اللعابي (النسبة المئوية للنفاذية)

الزمن (دقيقة)	تخفيف الإنزيم			
	الدورق الأول (٥:١)	الدورق الثاني (٢٥:١)	الدورق الثالث (١٢٥:١)	الدورق الرابع (٦٢٥:١)
الاستنتاج				

٣- أضف إلى الدورق الأول ٢٥ مل من المحلول ذو تركيز المادة الخاضعة المثالي (المحدد في التجربة السابقة). امزج المحتويات ولاحظ الوقت.

٤- بعد مرور دقيقتين أضف إلى أنبوبة المقياس اللوني ٣ مل من مزيج النشا و buffer solution والإنزيم الموجود في الدورق الأول.

٥- اعمل اختبار للنشا بإضافة ٣ قطرات من اليود.

٦- امزج محتويات الأنبوبة وحدد النسبة المئوية للنفاذية وسجل الرقم في الجدول -١٧.

٧- كرر الخطوات ٤- ٦ كل دقيقتين كما مذكور في التجارب السابقة وباستعمال عينة جديدة.

الجدول -١٧ : تأثير الرقم الهيدروجيني pH على فعالية الأميليز اللعابي (النسبة المئوية للنفاذية)

الزمن (دقيقة)	الرقم الهيدروجيني			
	الدورق الأول (٥)	الدورق الثاني (٦)	الدورق الثالث (٧)	الدورق الرابع (٩)
الاستنتاج				

٨- كرر الخطوات ٣-٧ للدوارق ٢ و٣ و ٤ مع العمل بدورق واحد في كل مرة.

٩- ارسم مخطط بياني للمعلومات.

ما هو الرقم الهيدروجيني pH المثالي لفعالية الأميليز اللعابي؟

هل تتماشى النتائج مع معرفتك حول الموقع الذي يعمل فيه هذا الإنزيم في الجسم؟

٤- تأثير درجة الحرارة على فعالية الأميليز

١- حضر خمس دوارق إيرلن ماير مرقمة ١- ٥ سعة ١٢٥ مل وأضف ٥٠ مل لكل دورق من المحلول ذو تركيز النشا المثالي (المحدد في التجارب السابقة).

٢- اغمر كل دورق من الدوارق الخمسة في قدح ماء بحيث تكون درجة حرارة القدح الأول ٥ والثاني ١٥ الثالث ٣٠ والرابع ٤٥ والخامس ٧٠ °م. وتثبت درجة الحرارة باستعمال الماء الثلجي أو الماء الحار حسب الحاجة. ويجب المحافظة على هذه الدرجات الحرارية بحيث لا تتغير أكثر من ± ٣ °م.

٣- أضف إلى الدورق الأول ١ مل من المحلول ذو التركيز الأنزيمي المثالي (المحدد في التجارب السابقة). امزج المحتويات ولاحظ الوقت.

٤- بعد مرور دقيقتين انقل ٣ مل من المزيج في الدورق الأول إلى أنبوبة المقياس اللوني.

٥- اعمل اختباراً للنشا بإضافة ٣ قطرات من اليود.

٦- امزج محتويات الأنبوبة وحدد النسبة المئوية للنفاذية وسجل الرقم في الجدول ١٨.

٧- كرر الخطوات ٤-٦ كل دقيقتين كما مذكور في التجارب السابقة وباستعمال عينة جديدة.

٨- كرر الخطوات ٣- ٨ للدوارق ٢ و ٣و ٤ و٥ والعمل بدورق واحد في كل مرة.

٩- ارسم مخطط بياني للمعلومات.

ما هو تأثير درجة الحرارة على فعالية الأميليز اللعابي؟

ب ـ التخليق الأنزيمي للنشا بواسطة الفوسفوريليزس

لقد لاحظت في التجارب السابقة من هذا المختبر تأثير تحلل النشا بالماء بواسطة مجموعة من الأنزيمات المسماة بالأميليزس. وتوجد أنزيمات تدعى الفوسفوريليزس phosphorylases يمكنها أيضاً تحليل النشا بالماء. وفي الحقيقة فإن هذه الأنزيمات تحلل النشا بصورة أسرع مما هي عليه في حالة الأميليز.

تختلف فعاليات هذه المجموعتين من الأنزيمات بعدد من الطرق بجانب معدلاتها في التحلل بالماء. فمثلاً تعمل الأميليزس على تجزئة النشا إلى وحدات المالتوز maltose والتي تحتاج إلى أنزيم آخر يدعى المالتيز maltase لإكمال عملية التحول إلى كلوكوز. أما الفوسفوريليزس فإنها تعمل على تجزئة النشا إلى وحدات الكلوكوز- فوسفات والتي تتحلل مرة أخرى إلى الكلوكوز وحامض الفوسفوريك تحت تأثير أنزيم الفوسفاتيز phosphatase. وأن الاختلاف الأكثر أهمية بين الأميليز والفوسفوريليز يكمن في عكسية reversibility تفاعل الفوسفوريليز والذي يسير بكلا الاتجاهين بينما يكون تفاعل الأميليز غير عكسي تقريباً (الشكل- ٥١). وفي الطريقة الآتية (الشكل- ٥٢) سوف تقوم بعزل الفوسفوريليز من البطاطا الطازجة fresh potatoes ثم تخليق النشا باستعمال هذا الإنزيم. ويمكنك التحكم في تكوين النشا من خلال الإضافة الدورية لليود إلى عينات مزيج التفاعل. فحالما يتكون النشا يتدرج اللون بعد إضافة اليود من ذلك الخاص بلون محلول اليود (لا يوجد نشا) إلى الأسود المزرق الذي يشير إلى وجود النشا.

١- قطّع البطاطا المقشرة إلى قطع مربعة. ثم ضع هذه القطع في الخلاط blender وأضف ٦٥ مل من الماء واعمل مجانسة لها إلى أن يتكون محلول متجانس يشبه الطين الرقيق القوام slurry. بعدها يمرر هذا المحلول خلال أربع طبقات من القماش المستعمل في لف الجبن cheesecloth وجمعه في قدح لإزالة بقايا قطع البطاطا.

شكل- ٥١: فعالية إنزيم phosphorylase

الجدول- ١٨: تأثير درجة الحرارة على فعالية الأميليز اللعابي (النسبة المئوية للنفاذية)

الزمن (دقيقة)	درجة الحرارة (°م)				
	الدورق الأول (٥)	الدورق الثاني (١٥)	الدورق الثالث (٣٠)	الدورق الرابع (٤٥)	الدورق الخامس (٧٠)
الاستنتاج					

٢- ضع قطعة من ورق الترشيح (واتمان رقم ١ whatman #1) على قمع بخنر Buchner funnel وبللها بالماء. اربط الأنبوب المطاطي بين الدورق flask والشفاطة المائية water aspirator ثم افتح حنفية الماء water faucet.

٣- اسكب راشح البطاطا filtrate في القمع. وبعد انتهاء عملية الترشيح افصل الأنبوب المطاطي من الشفّاطة ثم اغلق حنفية الماء.

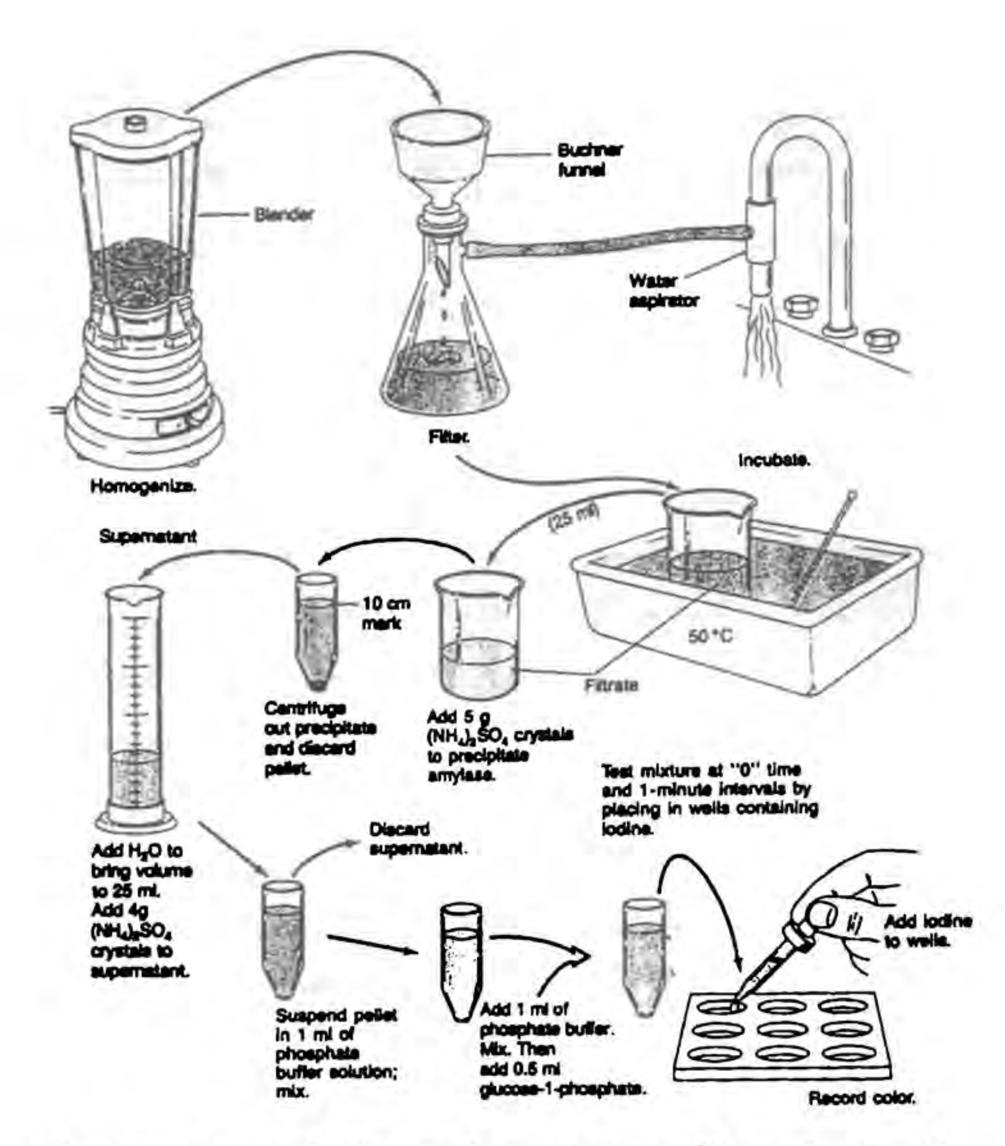
٤- اسكب الراشح في قدح، ثم ضع القدح في حمام مائي بدرجة ٥٠ْ م. وهذه الحرارة ستؤدي إلى تلف أنزيمات الأميليزس. لماذا يكون تلف هذه الأنزيمات ضرورياً في المستحضر؟

٥- بعد ٥ دقائق خذ ٢ مل من الراشح المسخن وضعه في قدح ثم أضف ببطء ٥ غم من بلورات كبريتات الأمونيوم [$(NH_4)_2\ SO_4$] ثم حرك المزيج إلى أن تذوب البلورات ويتكون راسب بني brown من الأميليز.

٦- باستعمال قلم الشمع علّم أنبوبة جهاز الطرد المركزي المخروطية ثم اسكب راشح اميليز في الأنبوبة إلى العلامة ١٠ سم.

٧- خذ قدحين كبيرين وضع كل واحد منهما في كفة ميزان وحاول موازنتها باستعمال الماء. ضع أنبوبة جهاز الطرد المركزي المخروطية المملوءة بالراشح في أحد القدحين، وضع أنبوبة طالب آخر في القدح الآخر وحاول موازنتهما باستعمال الماء إذا دعت الحاجة إلى ذلك. ثم ضع الأنبوبتين في جهاز الطرد المركزي بحيث تكونان متقابلين في الجهاز. اعمل طرد مركزي لهاتين الأنبوبتين لمدة ٥ دقائق بأعلى سرعة.

٨- اسكب السائل الطافي supernatant liquid من الأنابيب إلى اسطوانة مدرجة graduated cylinder. وأن الراسب قد لا يكون متماسكاً بشكل جيد لذا يفضل سكب السائل الطافي بشكل سريع. تخلص من الراسب بغسل أنبوبة جهاز الطرد المركزي.



شكل- ٥٢: التخليق الأنزيمي للنشا باستعمال إنزيم الفوسفوريليز phosphorylase enzyme

٩- أضف الماء إلى السائل الطافي لإكمال الحجم إلى ٢٥ مل. أضف ٤ غم من بلورات كبريتات الأمونيوم إلى السائل الطافي مع التحريك إلى أن تذوب البلورات ويتكون راسب بني آخر. وأن هذا الراسب هو الذي يجب أن تحتفظ به لأن معظمه يمثل أنزيم الفوسفوريليز.

١٠- اسكب المزيج في أنبوبة جهاز الطرد المركزي المخروطية وكرر عملية التوازن كما في الخطوة ٧. اعمل طرد مركزي بأقصى سرعة لمدة ٥ دقائق. وتخلص من السائل الطافي.

١١- أضف ١ مل من محلول phosphate buffer solution إلى الراسب مع التحريك. ثم أضف ٠,٥ مل من محلول الكلوكوز -١- فوسفات مع المزج بالحركة الدورانية. لاحظ الوقت.

١٢- ضع قطرة من محلول اليود في إحدى حفر لوحة البقع spot plate.

١٣- خذ جزء من المزيج في أنبوبة جهاز الطرد المركزي وضعه في الحفرة المحتوية على قطرة اليود. بعدها أضف ثلاث قطرات إضافية من اليود إلى الحفرة باستعمال ماصة باستور pasteur pipette. سجل التغيرات اللونية في الجدول-١٩.

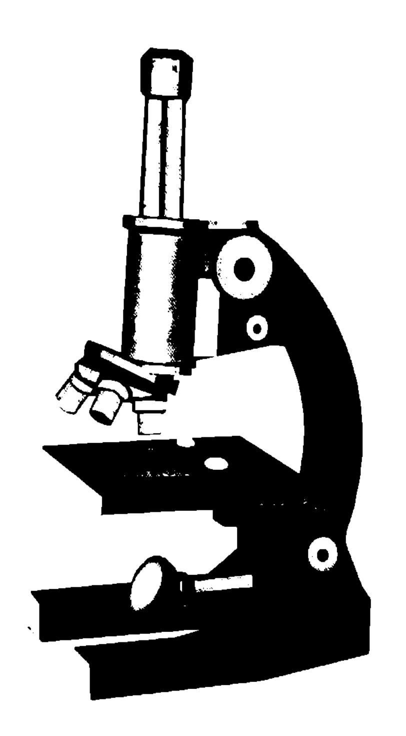
١٤- ضع قطرة أخرى من اليود في الحفرة الأخرى في لوحة البقع وكرر الخطوة ١٣. سجل التغيرات اللونية في الجدول- ١٩.

١٥- استمر بعمل قراءات كل دقيقة وبما هو مجموعه ٦ دقائق. كم يستغرق الوقت لكي يبدأ النشا بالتكون بكميات معينة؟

اذكر ثلاث طرق لتعجيل هذا التفاعل

الجدول -١٩: التخليق الأنزيمي للنشا بواسطة الفوسفوريليز

الزمن (دقيقة)	شدة اللون
صفر	
١	
٢	
٣	
٤	
٥	
٦	



المختبر الثامن

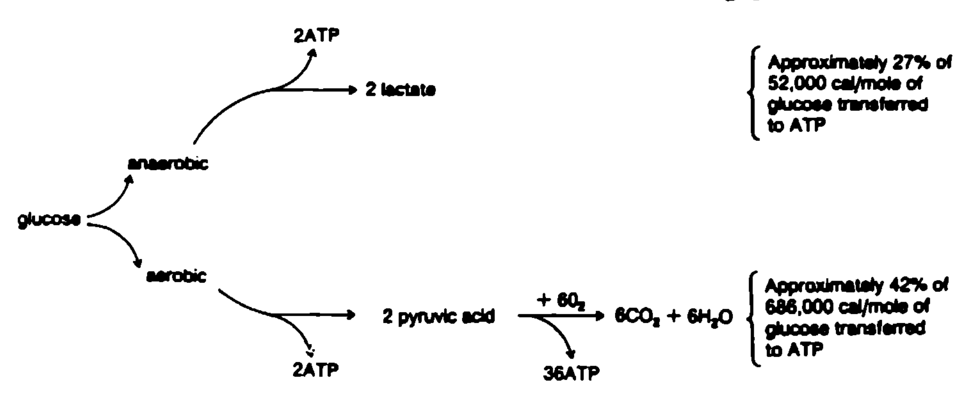
التنفس الخلوي

Cellular Respiration

تحصل النباتات والحيوانات على الطاقة التي تحتاجها في الفعاليات الحيوية من الأواصر الكيمياوية الموجودة في المواد الغذائية. وإن الطاقة في هذه الأواصر الكيمياوية هي الطاقة الشمسية solar energy التي تحولت إلى طاقة كيمياوية بعملية التركيب الضوئي التي تقوم بها النباتات الخضراء. وأن تحويل طاقة الأواصر الكيمياوية إلى طاقة يستفاد منها مثل الأصرة الفوسفاتية ذات الطاقة العالية في الأدينوسين ثلاثي الفوسفات ATP واستعمالها في النهاية من قبل الكائن الحي هي عبارة عن عمليات تدعى بمجموعها بالتنفس. ويمكن تقسيم التنفس بالمفهوم العام إلى هوائي aerobic (بوجود اوكسجين) أو لا هوائي anaerobic (بعدم وجود الأوكسجين). وقد تطور التنفس اللاهوائي أولاً ولازال الجزء المهم في العديد من الفعاليات الأيضية للنباتات والحيوانات. ويعد التنفس الهوائي أكثر كفاءة على أساس استعادة الطاقة energy recovery من المواد الغذائية. ويلخص الشكل- ٥٣ الخطوات المتعددة في التنفس اللاهوائي والهوائي والذي يتضمن سكر الكلوكوز البسيط السداسي الكاربون. وفضلاً عن الطاقة الكبيرة المتولدة في التنفس الهوائي مقارنة مع التنفس اللاهوائي فإن الكلوكوز يتجزأ في التنفس الهوائي بشكل كامل إلى ثنائي اوكسيد الكاربون والماء بينما يؤدي التنفس اللاهوائي بصورة عامة إلى تكوين نواتج نهائية مثل الحوامض العضوية والكحولات والتي قد تكون سامة.

تتحرر الطاقة من جزيئة الكلوكوز في التنفس الهوائي بثلاث مراحل هي تحليل السكر glycolysis ودورة كريبس Krebs cycle وسلسلة نقل الإلكترونات electron transport chain (الشكل- ٥٤). ففي عملية تحليل السكر تتحول جزيئة السكر السداسية الكاربون إلى جزيئتين من حامض البايروفيك pyruvic acid الثلاثي الكاربون والأدينوسين ثلاثي الفوسفات ATP من خلال سلسلة معقدة من التفاعلات الكيمياوية التي تحفزها الأنزيمات. وفي حالة وجود الأوكسجين يدخل حامض البايروفيك في سلسلة من التفاعلات المحفزة بالأنزيمات والتي تدعى بدورة كريبس. ففي أثناء دورة كريبس تزال ذرات الهيدروجين hydrogen atoms من مركبات دورة كريبس ويتم تجزئتها إلى بروتونات protons موجبة الشحنة

والكترونات عالية الطاقة ذات شحنة سالبة. وتمر هذه الإلكترونات من خلال سلسلة نقل الإلكترونات والتي هي عبارة عن سلسلة من الجزيئات التي تتأكسد (تفقد الإلكترونات) وتختزل (تكتسب الإلكترونات) بشكل متناوب. وفي أثناء تفاعلات الأكسدة والاختزال هذه يتم إدخال جزءً من طاقة الإلكترونات في أواصر ATP الفوسفاتية ذات الطاقة العالية. وفي نهاية السلسلة ترتبط البروتونات (ذرات الهيدروجين في الشكل) مع الإلكترونات التي تكون منخفضة الطاقة في هذه المرحلة والأوكسجين لتكوين الماء.



شكل- ٥٣: التنفس الهوائي واللاهوائي لجزيئة سكر الكلوكوز

يمكن توضيح عملية التنفس التي تجري في الكائن الحي من خلال قياس الطاقة المتحررة أو كمية الكلوكوز المستعملة أو كمية الأوكسجين المستهلكة أو كمية ثنائي أوكسيد الكاربون المتحررة. وفي هذا المختبر ستقوم بدراسة التنفس من خلال تحديد كمية الأوكسجين المستهلكة بصورة غير مباشرة.

أ- قياس تأثيرات التنفس Measuring the Effects of Respiration:

تعتمد العديد من الطرق المستعملة في دراسة التنفس على قياس التغيرات الحاصلة في حجم أو ضغط ثنائي أوكسيد الكاربون أو الأوكسجين. إذ أن أي تغير في حجم أو ضغط أحد هذين الغازين في نظام مغلق يتنفس في داخله الكائن الحي يمثل الفرق النهائي بين الأوكسجين المستهلك (والذي يقلل بحد ذاته الضغط والحجم

في الوعاء المغلق) وثنائي اوكسيد الكاربون المتكون (والذي يزيد بحد ذاته من الضغط والحجم). لذا فإذا ما تم امتصاص ثنائي اوكسيد الكـاربون المتكـون بطريقـة مـا فـإن التغيرات يمكن أن تعزى إلى استهلاك الأوكسجين oxygen consumption.

استهلاك الأوكسجين بواسطة البزاليا النابتة

يوضح الشكل- ٥٥ مقياس التنفس respirometer (المستعمل في الكشـف عـن التغيرات الحاصلة في ضغط الغاز وحجمه). يتألف هذا الجهاز مـن وعـائين vessels يمكن إغلاقها نحو الخارج. توضع المادة التي تقوم بعملية التنفس respiration material في أحد الوعائين مع هيدروكسيد البوتاسـيوم (KOH) الـذي يمـتص ثنـائي أوكسـيد الكاربون. ونظراً لتأثر حجم الغـاز بـبعض العوامـل مثـل الضـغط الجـوي ودرجـة الحرارة لذا يستخدم الوعاء الثاني بوصـفة حجـرة تعـويض compensation chamber إذ انه يكون مماثلاً للوعاء الأول باستثناء خلوه من المادة الحية قيد الدراسة. تأكد مـن أنه يجب الأخذ بنظر الاعتبار التغيرات الحاصلة في حجم الغاز في الوعاء الثاني عنـد حساب التغيرات الحاصلة في الوعـاء الأول (حجـرة التـنفس respiration chamber) سيقوم كل طالب في هذا الجزء من المختبر بتحديد معدل تنفس البزاليـا النابتـة علـى أساس الأوكسجين المأخوذ.

١- املأ أنبوبة اختبار التـنفس بنصـفها بالبزاليـا النابتـة باتبـاع المخطـط الموضـح في الشكل- ٥٥.

٢- ضع حشوة خفيفة من القطن فوق البزاليا، ثم ضع مادة هيدروكسيد البوتاسـيوم فوق القطن بارتفاع ١٢ ملم. وبذلك يفصل القطن مادة هيدروكسيد البوتاسيوم عن بذور البزاليا الحية. ويجب أن لا يكـون القطـن مرصوصـاً بأحكـام. وحالما تقوم البزاليا بعملية التنفس يقوم هيدروكسيد البوتاسيوم بإزالـة ثنـائي أوكسـيد الكاربون بالسرعة نفسها التي يتكون فيها. لماذا يكون من الضروري إزالة ثنـائي أوكسيد الكاربون من الأنبوبة؟

٣- حضر الأنبوبة الثانية (أنبوبة التعويض compenastion tube) بالطريقـة نفسـها في

الأنبوبة الأولى ولكن استعمل الخرز الزجاجية glass beads بدلاً من البزاليا. ما هو السبب في استخدام مادة خاملة inert material؟

٤- ضع سدادة مطاطية في كل أنبوبة، ويربط في كل سدادة أنبوبة شعرية capillary tube (الشكل- ٥٥).

٥- ضع الأنبوبتين بوضع عمودي من خلال ماسك مرتبط بحامل stand (الشكل- ٥٥). وباستعمال قطارة عين eyedropper ضع كمية كافية من الصبغة في نهاية كل أنبوبة شعرية بحيث ينسحب ما طوله ١٢ ملم من الصبغة إلى داخل الأنبوبة الشعرية (الشكل-٥٥).

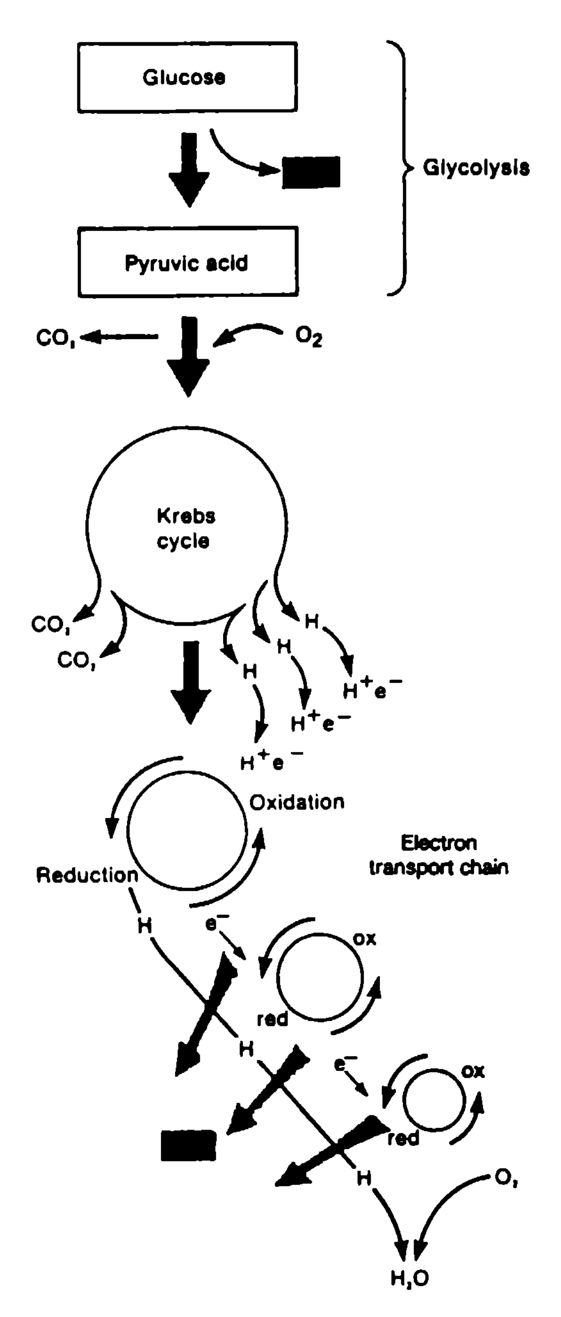
٦- بعد ٢-٣ دقيقة من وصول ضغط الغاز إلى حالة التوازن، لاحظ وضع النهاية الداخلية لعمود الصبغة dye column على المقياس المليمتري (الشكل- ٥٥). سجل هذه القراءة في الجدول-٢٠. بعدها ضع ماسك قارص pinch clamp على الأنبوبة المطاطية لكل أنبوبة اختبار. (ملاحظة: نظراً لحساسية المقياس التنفسي للتغيرات الحجمية بسبب الحرارة فيجب وضعه بعيداً عن المصادر الحرارية مثل المصابيح lamps واللوحات الساخنة hot plates أو النوافذ المواجهة للشمس).

٧- سجل القراءات الخاصة بموقع عمود الصبغة كل دقيقة ولفترة خمس دقائق. سجل المعلومات في الجدول-٢٠. (ملاحظة: إذا كانت حركة الصبغة سريعة نوعما فيمكنك تسجيل القراءات بفترات أقصر - ٢٠ أو ٣٠ ثانية- أو أن عمود الصبغة قد يصل إلى الجزء المنحني من الأنبوبة قبل أن تأخذ المعلومات الكافية). ويمكن إعادة عمود الصبغة إلى النهاية الخارجية من الأنبوبة الشعرية من خلال فتح الماسك القارص وميلان الأنبوبة الشعرية. لماذا تتحرك الصبغة باتجاه أنبوبة التنفس وليس بعيداً عنها؟

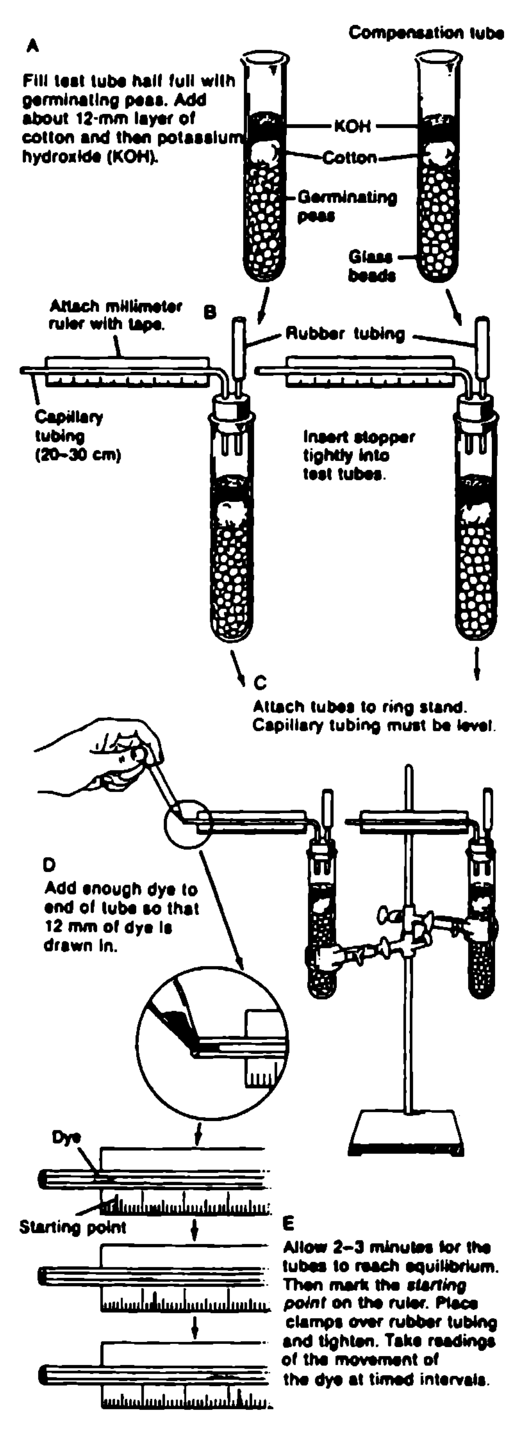
تحت أي ظروف يمكن أن تتحرك الصبغة بعيداً عن أنبوبة التنفس؟

٨- كرر الطريقة لتحديد تأثيرات درجة الحرارة على التنفس وسجل المعلومات في الجدول-٢٠. ويجب على الطلبة اختيار درجات حرارة مختلفة لتوضيح التأثيرات المختلفة لدرجة الحرارة.

٩- ارسم مخطط بياني من خلال معلومات الجدول-٢٠. حدد كل خط بياني بعلامة مناسبة.



شكل- ٥٤: وحدات الطاقة ATP المتولدة خلال التنفس الخلوي



شكل – ٥٥: طريقة قياس استهلاك الأوكسجين في البزاليا النامية germinating peas

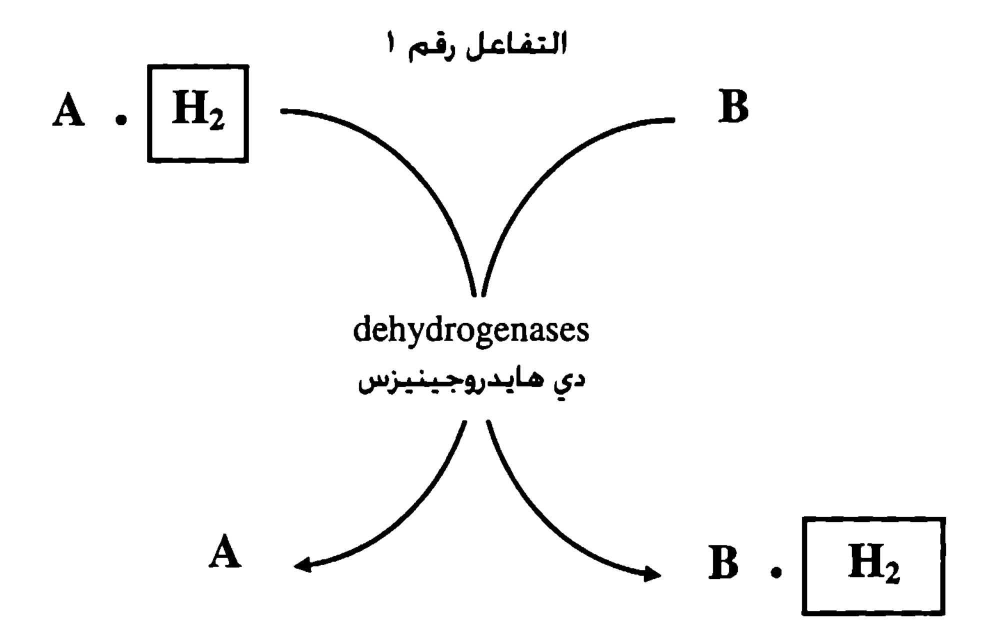
جدول- ٢٠: المعلومات الخاصة بتنفس البزاليا النابتة (قراءات المقياس التنفسي هي بالمليمتر)

الزمن (دقيقة)	درجة حرارة المختبر: ________ °م			________ °م		
	انبوب التنفس (١)	انبوب التعويض (٢)	المعلومات المصححة (١ ناقص ٢)	انبوب التنفس (١)	انبوب التعويض (٢)	المعلومات المصححة (١ ناقص ٢)

ب ـ قياس الأكسدة الحيوية Measuring Biological Oxidation:

تعد تفاعلات الأكسدة والإختزال مهمة في تحرير الطاقة من الكلوكوز وخزنها في جزيئات ATP. وهناك مركبات محتوية على الحديد في المايتوكوندريا تلعب دوراً في هذه التفاعلات وتدعى هذه المركبات بالسايتوكرومات (الصبغات الخلوية) cytochromes. وتحدث الأكسدة في هذه التفاعلات بوجود الأوكسجين. ويوضح التفاعل رقم (١) مثالاً على تفاعل الأكسدة والاختزال حيث أن A تمثل معطي الهيدروجين hydrogen donor و B تمثل مستلم الهيدروجين hydrogen acceptor.

التفاعل رقم ١

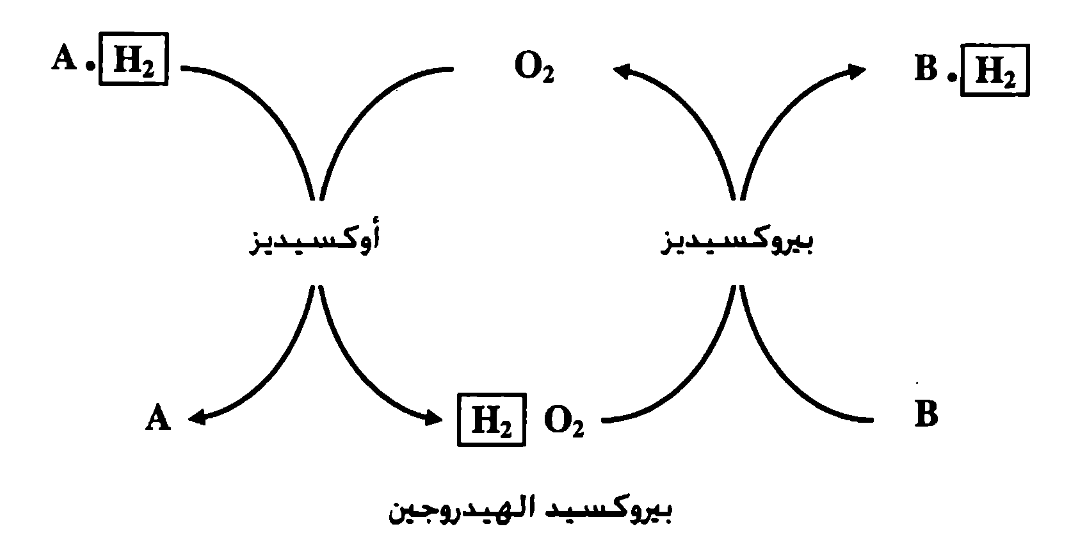


لذا فإن كل عملية أكسدة ترافقها عملية اختزال في وقت واحد. وأن الطاقة اللازمة لإزالة ذرات الهيدروجين في تفاعلات الأكسدة يتم تجهيزها بعملية الاختزال المصاحبة للأكسدة. ولكي تحدث مثل هذه التفاعلات لابد من وجود إنزيمات تدعى ديهايدروجينيزس Dehydrogenases.

توجد ديهايدروجينيزس خاصة تدعى بالأوكسيديزس oxidases تستخدم الأوكسجين كمستلم للهيدروجين. وتتألف معظم الأوكسيديزس من معدن مثل النحاس copper أو الحديد iron أو الزنك zinc مع معقد يحتوي على الرايبوفلافين

riboflavin- containing complex. وأن نقل الهيدروجين من المادة الخاضعة substrate إلى الأوكسجين بواسطة الأوكسيديز يؤدي في العادة إلى تكوين بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) كما موضح في التفاعل رقم ٢. ويعد بيروكسيد الهيدروجين ساماً للأنسجة، وهناك إنزيمان يمنعان هذا التأثير هما البيروكسيديز peroxidase والكاتاليز catalase.

التفاعل رقم ٢



بيروكسيد الهيدروجين

يقوم إنزيم البيروكسيديز كما موضح في التفاعل رقم ٢ بإزالة الأوكسجين من بيروكسيد الهيدروجين والذي تتم تهيئته لاستلام الهيدروجين من مادة خاضعة أخرى لتكوين المزيد من بيروكسيد الهيدروجين. ويلاحظ في التفاعل رقم ٢ أن جزيئة أخرى (هي B) تأخذ الهيدروجين المتحرر من بيروكسيد الهيدروجين وبذلك فإنها تختزل. لذا يزال التأثير السمي لبيروكسيد الهيدروجين. ونظراً لأهمية تفاعلات الأكسدة والاختزال في عملية التنفس الخلوي لذا يجب عليك التعرف على هذه التفاعلات.و في هذا الجزء من المختبر سيقوم كل طالب بدراسة تفاعل الأكسدة المتضمن أنزيم البيروكسيديز.

يتأكسد الكواياكول Guaiacol بواسطة بيروكسيد الهيدروجين وبوجود إنزيم البيروكسيديز لتكوين ناتج ملون colored product (التفاعل رقم ٣).

التفاعل رقم (٣)

$$\text{Guaiacol} + H_2O_2 \xrightarrow{\text{بيروكسيديز}} \text{oxidized guaiacol} + 2H_2O$$

يمكن متابعة هذا التفاعل بالمقياس اللوني من خلال قياس كمية الضوء التي يمتصها الكواياكول.

١- قشر اللفت turnip وقطّعه إلى قطع صغيرة، ثم ضع هذه القطع في خلاط blender لمدة ٣٠ ثانية. أو ضع القطع في هاون mortar مع رمل الكوارتز quartz sand ثم اسحقه باستعمال يدة الهاون pestle (الشكل – ٥٦).

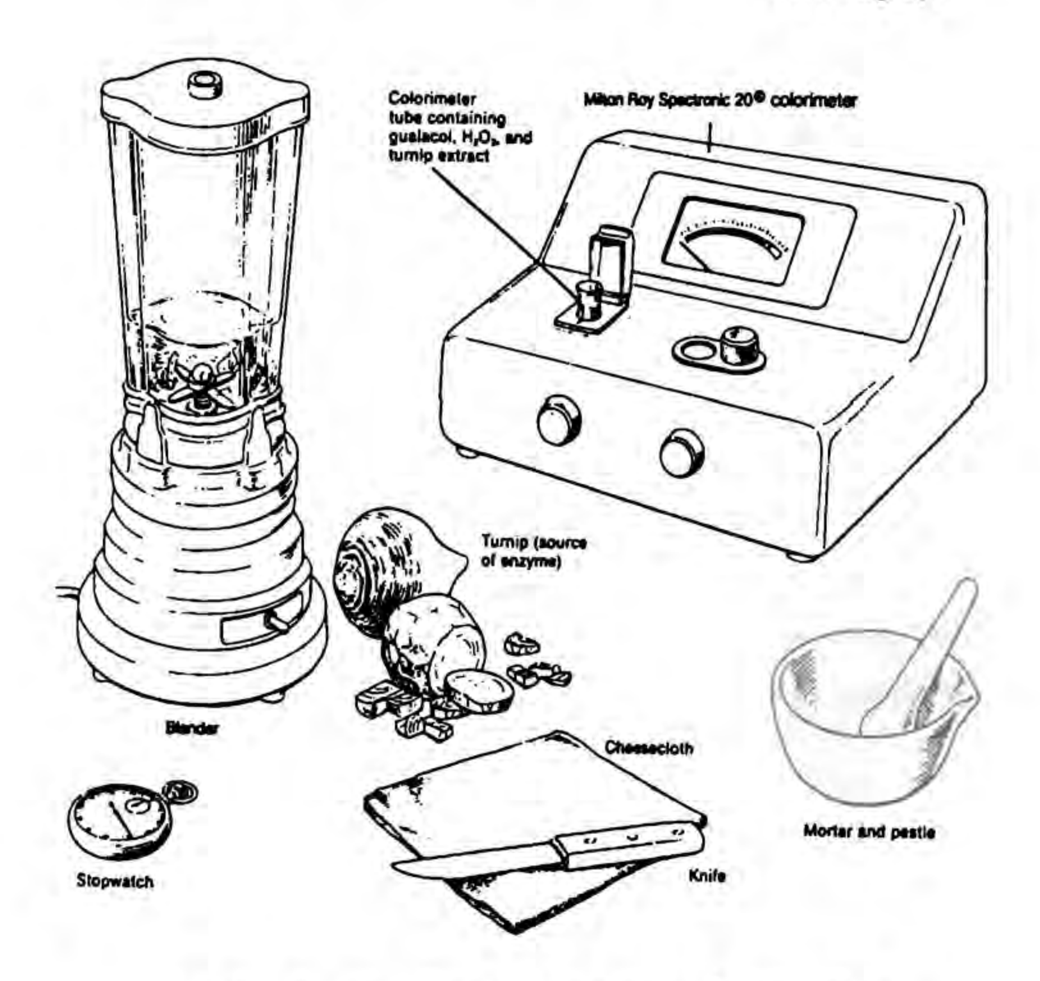
٢- رشح محلول المجانسة homogenate في قدح باستعمال طبقة مزدوجة من القماش المستعمل في لف الجبن cheesecloth. وحاول أن تعصر ما تستطيع من عصارة محلول المجانسة. بعدها خفف ١ مل من العصارة مع ٢٠٠ مل من الماء المقطر.

٣- باستعمال طول موجي ٥٠٠ نانومتر حضّر المقياس اللوني من خلال blank وذلك باستعمال أنبوبة محتوية على ٠,٠١ مل من الكوايا كول و ٠,٢ مل من بيروكسيد الهيدروجين (٠,٩٪) و ٩,٧ مل من الماء.

٤- اخلط ٠,٠١ مل من الكواياكول و ٠,٢ مل من بيروكسيد الهيدروجين

الكواياكول وبيروكسيد الهيدروجين في أنبوبة المقياس اللوني colorimeter tube. امزج من خلال سكب المزيج في أنبوبة الاختبار ثم أعادته إلى أنبوبة المقياس اللوني وبشكل سريع.

٥- امسح أنبوبة المقياس اللوني وضعها في جهاز المقياس اللوني. ثبت الساعة ولاحظ النسبة المئوية للنفاذية كل ٢٠ ثانية لمدة دقيقتين. سجل المعلومات في الجدول- ٢١.



شكل-٥٦: الأجهزة المستخدمة لاستخلاص إنزيم البيروكسيدز
peroxidase enzyme

الجدول-٢١: فعالية البيروكسيديز في نسيج اللفت (النسبة المئوية للنفاذية)

الزمن (ثانية)	ا مل من مستخلص اللفت	٠,٥ مل من مستخلص اللفت	٢ مل من مستخلص اللفت	١ مل من مستخلص اللفت المغلي	ا مل متخلص + ٠,٥ مل من فلوريد الصوديوم
٢٠					
٤٠					
٦٠					
٨٠					
١٠٠					
١٢٠					

ارسم مخطط بياني يوضح العلاقة بين القراءات في الجدول - ٢١ والزمن كرر التجربة بتغيير حجوم المستخلص (٠,٥ مل و ٢ مل).

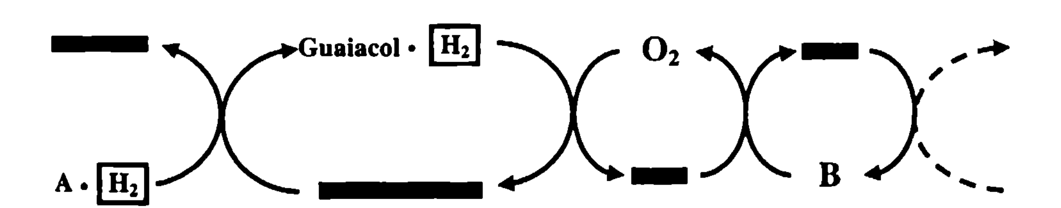
حاول قياس تأثير المستخلص المغلي لبضع دقائق والمبرد فيما بعد اعمل اختبارا لتأثير إضافة ٠,٥ مل من فلوريد الصوديوم NAF (٠,٠١ مولار) إلى مزيج التفاعل.

تحذير: إن فلوريد الصوديوم مادة سامة.

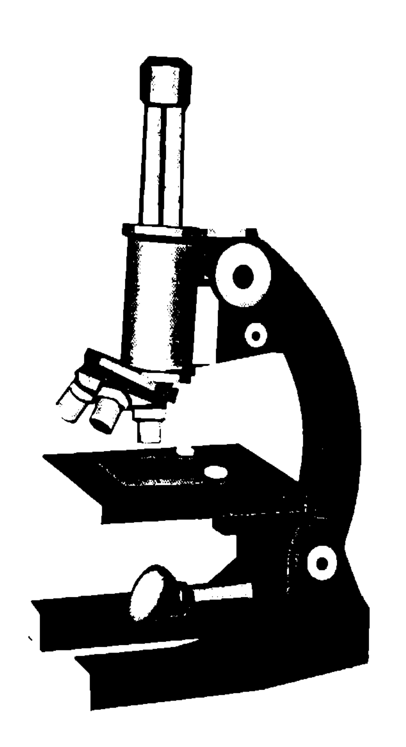
ماذا يمكنك الاستنتاج من هذه المعلومات حول فعالية البيروكسيديز في نسيج اللفت؟

املأ الفراغات (الخطوط السميكة) في التفاعل رقم ٤. حدد معطي الهيدروجين ومستلم الهيدروجين والتفاعل المحفز بإنزيم البيروكسيديز والتفاعلات المحفزة بالديهايدروجينيز.

التفاعل رقم (٤)



في حالة تفاعلات الأكسدة والاختزال ما هو الجزء مـن ذرة الهيـدروجين الـذي يتم نقله خلال الحوامل carrier المختلفة؟



المختبر التاسع

التركيب الضوئي

Photosynthesis

يعتمد وجود العالم الحي بشكل تام على الطاقة التي تأخذها النباتات الخضراء وبقية الكائنات الحية من خلال عملية التركيب الضوئي. وهذا يعني أن المصدر النهائي للطاقة التي تستهلكها الكائنات الحية هو الطاقة الشمسية التي يتم استخدامها بعملية التركيب الضوئي في صنع مواد عضوية جديدة. وتقوم الكائنات الحية بالاستفادة من نواتج عملية التركيب الضوئي ومن بعض المركبات الصغيرة اللاعضوية الموجودة في البيئة لصنع العديد من المركبات المعقدة التي تشكل تركيب الخلية وتعد أساسية لوجود هذه الكائنات الحية. ويمكن تمثيل التفاعل في عملية التركيب الضوئي في النباتات كما يأتي:

$$6\,CO_2 + 6H_2O \xrightarrow[\text{كلوروفيل}]{\text{ضوء}} C_6H_{12}O_6 + 6O_2$$

ثنائي أوكسيد الكاربون   ماء   سكر   أوكسجين

ويتضح من هذه المعادلة أن صنع الكاربوهيدرات يمثل المظهر الأساسي في هذه العملية. ولابد من الإشارة إلى أن عملية التركيب الضوئي لا تتم بخطوة واحدة كما يتبادر إلى الذهن من هذه المعادلة. إذ أنه عملية معقدة تتضمن تفاعل العديد من المركبات. ويمكن تقسيم العدد الكبير من التفاعلات إلى مجموعتين:

١ - التفاعلات الضوئية أو الضوئية الكيمياوية photochemical reactions التي تستلزم وجود الضوء.

٢- تفاعلات الظلام dark reations أو التفاعلات الحيوية التخليقية biosynthetic التي لا تستلزم وجود الضوء.

ففي حالة تفاعلات الضوء تستخدم الطاقة الإشعاعية radiant energy لإنجاز غرضين:

● تعمل الطاقة الضوئية على تجزئة جزيئات الماء إلى الأوكسجين والهيدروجين حيث يتم نقل الهيدروجين إلى مادة نيوكليوتايد فوسفات ($NADP^+$) لتكوين NADPH والذي يقوم بدوره بنقل الهيدروجين إلى جزيئات أخرى.

● يتم تحويل الطاقة الضوئية الممتصة بواسطة الكلوروفيل إلى طاقة كيمياوية تخزن في جزيئة الأدنيوسين ثلاثي الفوسفات ATP. ويحدث هذا التحول في البلاستيدات الخضراء حيث يتضمن نقل الإلكترونات من جزيئات الكلوروفيل المتهيجة 'excited' خلال سلسلة من المستلمات acceptor molecules (المتضمنة السايتوكرومات cytochromes) والتي تشكل نظام نقل الإلكرونات electron transport system. ويدعى تكوين ATP المعتمد على الضوء باسم الفسفرة الضوئية photophosphorylation لتمييزها عن الفسفرة التأكسدية oxidative phosphorylation التي تتم في المايتوكوندريا.

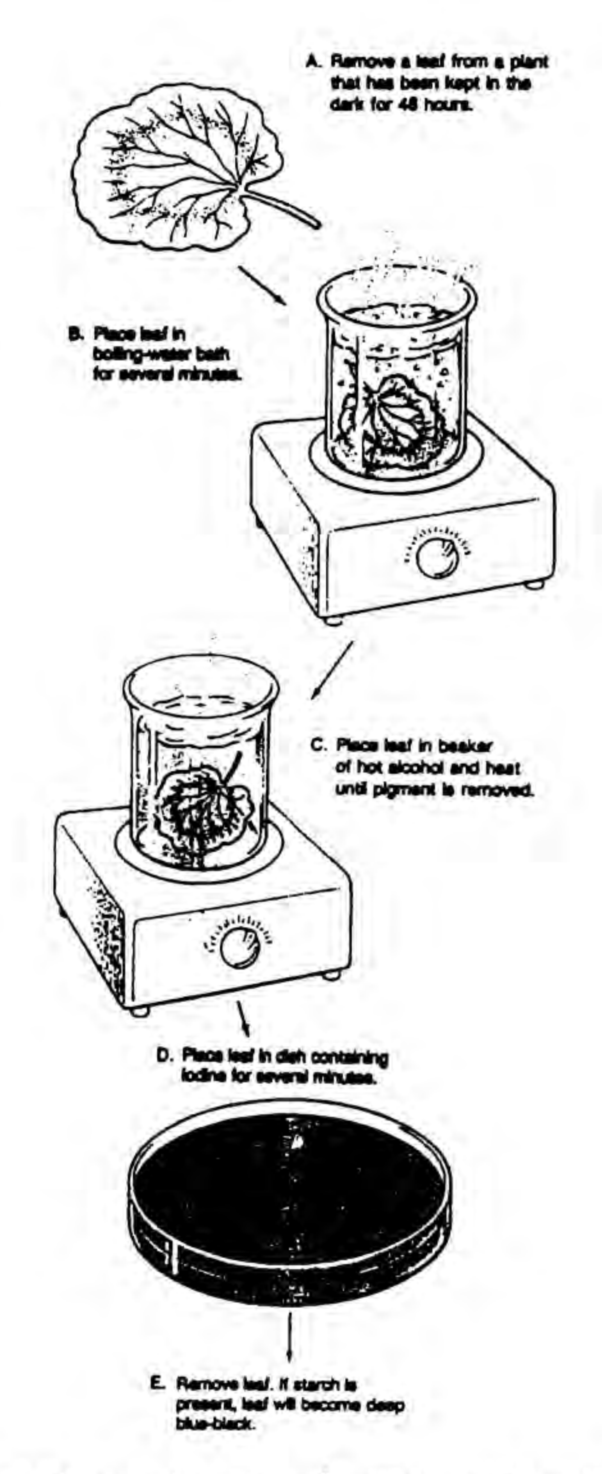
لذا فإن تفاعلات الضوء تؤدي إلى تكوين NADPH و ATP وتحرير الأوكسجين. أما في تفاعلات الظلام فتتم الاستفادة من NADPH و ATP لاختزال ثنائي أكسيد الكاربون إلى الكاربوهيدرات. وسيتم في هذا المختبر التعرف على دور الضوء وثنائي اوكسيد الكاربون وصبغات البلاستيدات الخضراء في عملية التركيب الضوئي.

أ- دور الضوء Role of Light:

١- حاجة الضوء لعملية التركيب الضوئي

لقد أوضحت التجارب بأن معظم السكر المتكون في أوراق النبات يتحول بسرعة إلى نشا starch. وأن النشا لا يمثل الناتج المباشر لعملية التركيب الضوئي إلا أن عملية تخليقه تمثل دليلاً غير مباشراً على فعالية عملية التركيب الضوئي.

سيوفر المدرس لكل طالب نباتات إبرة الراعي geranium plants المحفوظة في الظلام لفترة ٤٨ ساعة وتلك المحفوظة في الضوء لفترة ٤٨ ساعة. اعمل اختباراً لورقة من النباتات المحفوظة في الظلام بوجود النشا وباتباع الطريقة الآتية (الشكل- ٥٧):



شكل – ٥٧: طريقة تقدير أهمية الضوء في عملية البناء الضوئي

١- اغلي الورقة في حمام مائي لبضع دقائق، بعدها أزل الصبغة من خلال وضع الورقة في كحول حار hot alcohol.

تحذير: سخن الكحول في قدح منفصل على لوحة ساخنة ولا تعمل التسخين على مصباح بنزن bunsen burner.

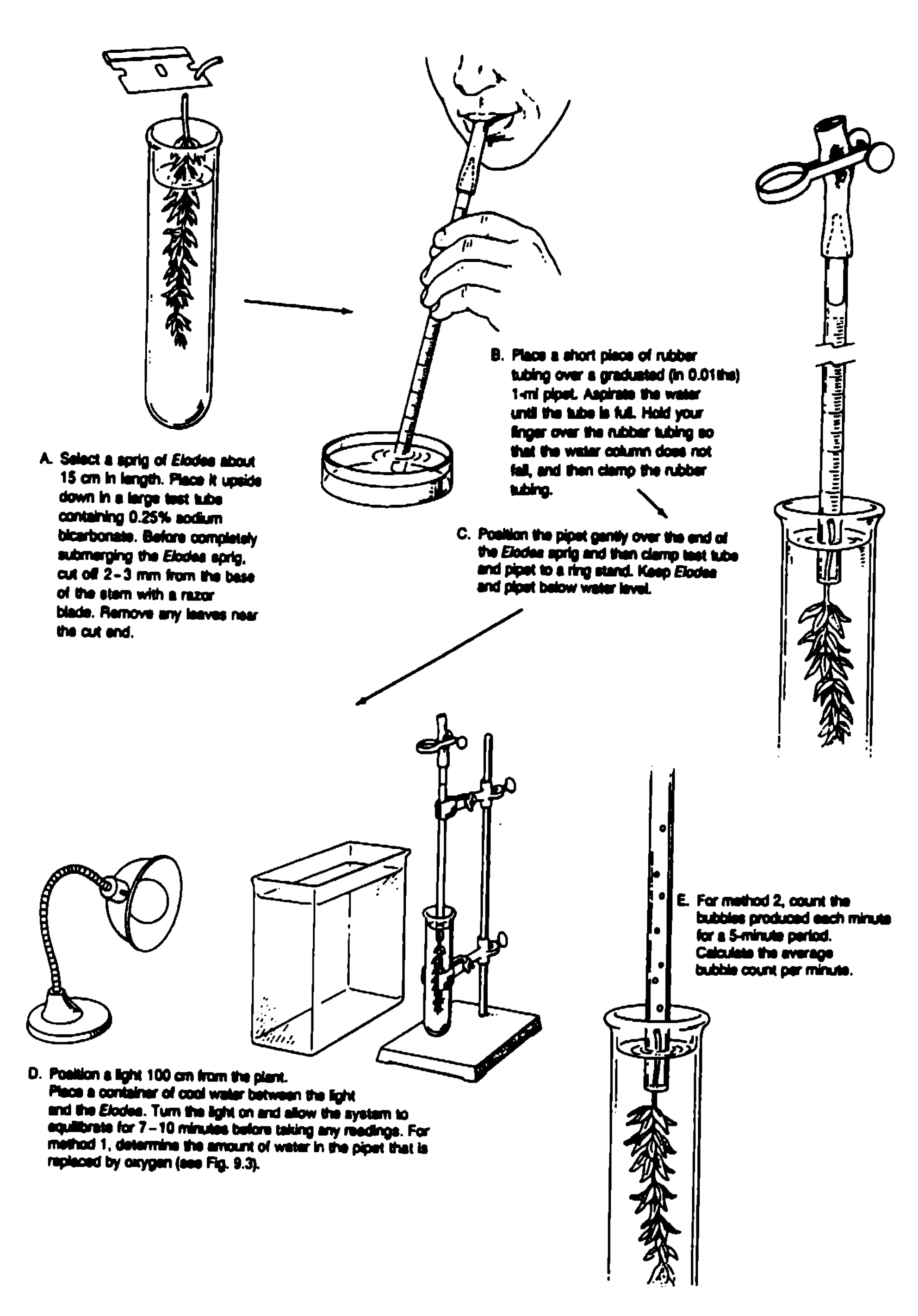
٢- انقل الورقة إلى طبق بتري يحتوي على اليود. ففي حالة وجود النشا يصبح لون الورقة أسود مزرق عميق.

٣- اعمل اختباراً لوجود النشا في النباتات المعرضة لضوء مستمر لمدة ٤٨ ساعة.

من هذه الملاحظات ماذا يمكنك الاستنتاج حول حاجة الضوء لعملية التركيب الضوئي؟

تأثير شدة الضوء على معدل التركيب الضوئي

نظراً لكون الأوكسجين ناتجاً عرضياً لعملية التركيب الضوئي فإنه يمكن الاستفادة من تحرير الأوكسجين في تصميم تجربة لقياس تأثير التغيرات الحاصلة في شدة الضوء على عملية التركيب الضوئي. إذ يتم في هذه الدراسة تغيير شدة الضوء من خلال وضع غصن الأيلوديا الصغير *Elodea* sprig على مسافات متغيرة من مصدر ضوئي ثابت. ويمكنك استعمال أي من الطريقتين الآتيتين: ففي الطريقة الأولى التي هي عبارة عن طريقة شبه كمية semiquantitative procedure تتم مساواة كمية الأوكسجين المتكونة مع كمية الماء المزاحة في ماصة pipet مرتبطة مع غصن الأيلوديا الصغير (الشكل- ٥٨). أما في الطريقة الثانية فيتم قياس التغيرات الحاصلة في معدل التركيب الضوئي بشكل تغيرات في كمية الأوكسجين المتكونة بهيئة فقاعات bubbles، إذ تشير الفقاعات العديدة إلى فعالية أعلى في التركيب الضوئي مما هي عليه في حالة الفقاعات القليلة (الشكل – ٥٨).



شكل- ٥٨ : طرق تقدير تأثير شدة الضوء light intensity على عملية البناء الضوئي

أ - الطريقة الأولى Method 1

١- انتخب غصن أيلوديا صغير طوله حوالي ١٥ سم بحيث يكون سليماً من أي تلف. أدخل هذا الغصن بشكل مقلوب upside down في داخل أنبوبة اختبار كبيرة مملوءة بمحلول بيكاربونات الصوديوم (٠,٢٥٪) (الشكل- ٥٨). ويعد هذا المحلول مصدراً لثنائي أوكسيد الكاربون لعملية التركيب الضوئي. وقبل غمر النبات بأكمله اقطع ٢- ٣ ملم من نهاية الساق المعاكسة للجهة النامية growing point باستعمال شفرة حلاقة بحيث لا تعمل على سحق الساق. وحاول إزالة الأوراق الموجودة ضمن المليمترات القليلة من النهاية المقطوعة.

٢- خذ ماصة سعتها ١مل مدرجة إلى مئة تدريج وضعها بوضع مقلوب. ثم ضع قطعة صغيرة من أنبوب مطاطي في النهاية الرفيعة للماصة. امسح هذا الأنبوب المطاطي بقطنه مبللة بالكحول الاثيلي (٧٠٪). اتركه لكي يجف. ثم اسحب محلول بيكربونات الصوديوم بواسطة هذه الماصة لحين امتلائها. امسك نهاية الأنبوب المطاطي بإصبعيك لمنع نزول عمود الماء، ثم اربط الماسك clamp حول الأنبوب وكما في الشكل-٥٨.

٣- ضع الماصة على النهاية المقطوعة لنبات الأيلوديا وثبتها بماسك يرتبط بحامل كما في الشكل- ٥٨. اجعل الماصة وأوراق غصن الأيلوديا الصغير تحت مستوى سطح الماء.

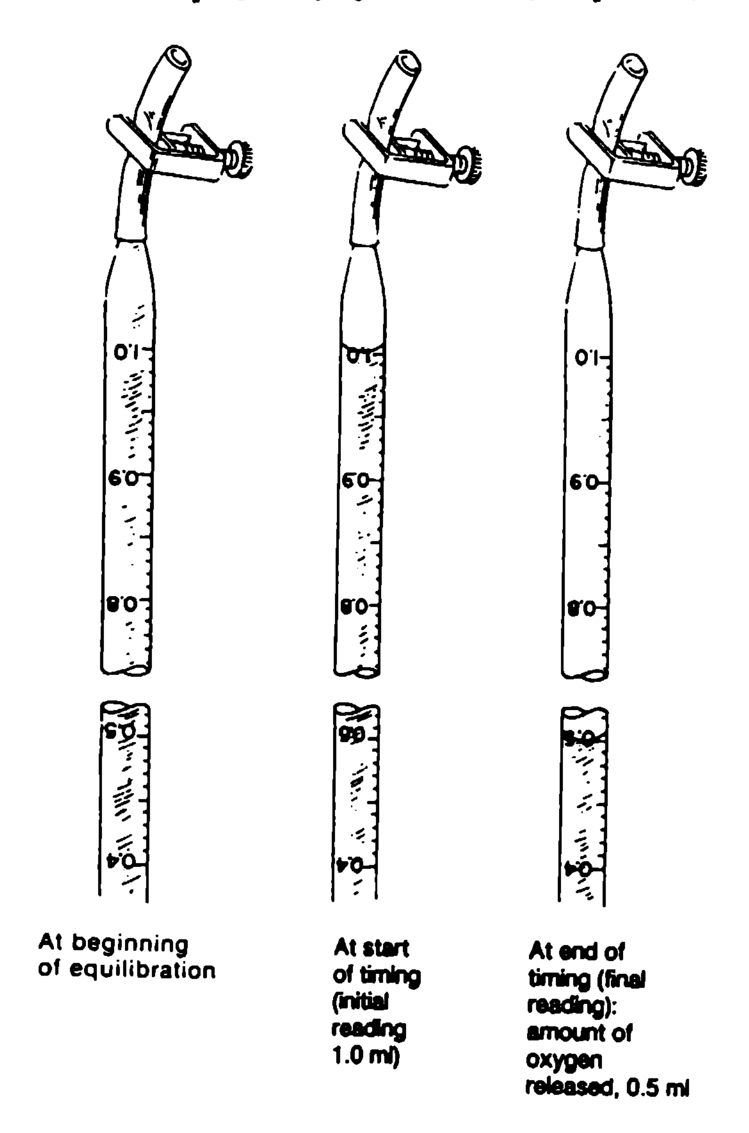
٤- حضر عاكس reflector يحتوي على مصباح قوة ٢٠٠ واط ووعاء يحتوي على ماء بارد وثبتهما في أماكنهما كما موضح في الشكل- ٥٨. لماذا يستعمل وعاء ماء بارد في هذا النظام؟ عندما يكون نبات الأيلوديا على مسافة ١٠٠ سم افتح ضوء المصباح واترك النظام لكي يتوازن لفترة ٧- ١٠ دقائق. لماذا؟

٥- حدد الكمية الكلية للأوكسجين المتحررة من النبات في فترة ١٠ دقائق من خلال تحديد كمية الماء المزاحة في الماصة في أثناء هذه الفترة. ويوضح الشكل- ٥٩ كيفية عمل ذلك.

٦- حدد كمية الأوكسجين المتكونة على مسافتي ٥٠ و ١٠ سم من مصـدر الضـوء. دوّن النتائج في الجدول- ٢٢. ثم ارسم مخطط بياني.

ب - الطريقة الثانية Method 2

رتب المواد كما في الطريقة الأولى. ومن غير الضروري استعمال ماصة مدرجة.



شكل- ٥٩: طريقة قياس الأوكسجين المتولد خلال عملية البناء الضوئي

الجدول- ٢٢: تأثيرات شدة الضوء على فعالية عملية التركيب الضوئي

البعد عن الضوء سم	حجم الأوكسجين (مل)	معدل عدد الفقاعات
١٠٠		
٥٠		
١٠		

ويمكن استعمال أي أنبوبة زجاجية تتناسب فوق النهاية المقطوعة لنبات الأيلوديا.

١- ضع الأنبوبة على مسافة ١٠٠ سم من مصدر الضوء، ثم اترك النظام لكي يتوازن لفترة ٧- ١٠ دقائق. بعدها حدد معدل التركيب الضوئي من خلال عدد الفقاعات bubbles المتكونة في الدقيقة الواحدة ولفترة ٥ دقائق. احسب معدل عدد الفقاعات في الدقيقة وسجل نتائجك في الجدول- ٢٢.

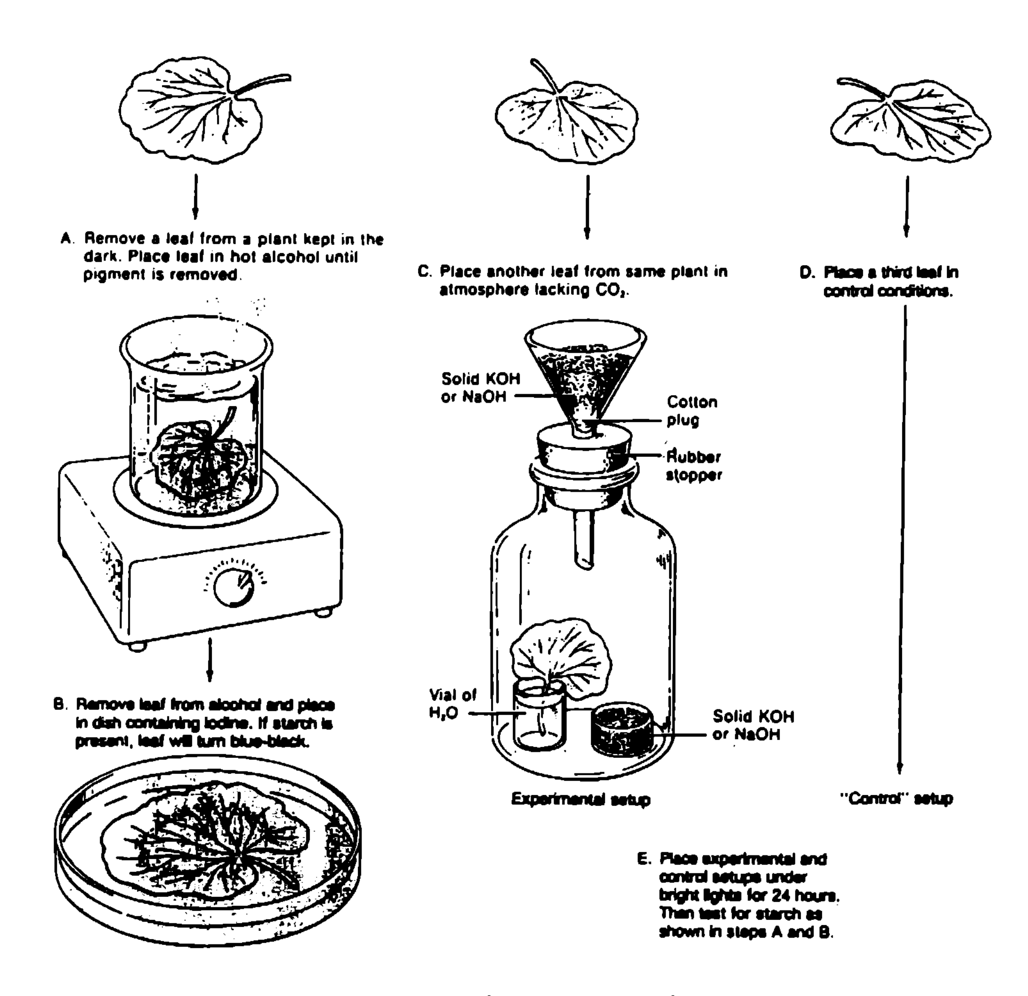
٢- ضع الأنبوبة على مسافة ٥٠ سم، ثم اترك النظام لكي يتوازن لفترة ٧-١٠ دقائق. احسب معدل عدد الفقاعات. كرر هذه الطريقة على مسافة ١٠ سم. ارسم مخطط بياني للنتائج.

إذا ازدادت شدة الضوء فهل يزداد معدل التركيب الضوئي (كما يقاس بالأوكسجين المتكون)؟ وإذا لم تحصل الزيادة ماذا يعني ذلك؟

ب- دور ثنائي أوكسيد الكاربون Role of Carbon Dioxide:

١- حاجة ثنائي أوكسيد الكاربون لعملية التركيب الضوئي

لبيان أهمية ثنائي أوكسيد الكاربون في عملية التركيب الضوئي سيتم استعمال الجهاز المبين في الشكل- ٦٠.



شكل- ٦٠: طريقة تقدير أهمية غاز ثنائي أوكسيد الكربون لعملية البناء الضوئي

١- خذ ورقة من نبات إبرة الراعي geranium الذي ترك في الظلام لفترة ٢٤ ساعة. اعمل اختباراً حول وجود النشا في الورقة من خلال غمرها في كحول ساخن لحين فقدان لونها الأخضر، ثم ضعها في طبق بتري يحتوي على اليود (الشكل- ٦٠).

تحذير: سخن الكحول في قدح منفصل على لوحة ساخنة، ولا تعمل التسخين على مصباح بنزن.

ارجع النبات إلى الظلام في الوقت الذي تعمل فيه اختبار النشا. فإذا كانت

نتيجة اختبار النشا موجبة، خذ نباتاً آخر واعمل اختباراً للنشا في الورقة. كرر هذه العملية لحين الحصول على نبات يعطي تفاعلاً سالباً أو ضعيفاً جداً للنشا. لماذا تكون هذه الخطوة ضرورية؟

٢- خذ ورقة أخرى من نبات يعطي تفاعلاً سالباً للنشا، وضع الورقة في الجهاز المبيّن في الشكل- ٦٠. ضع مصباح ذو قوة ٢٠٠ واط قرب الجهاز بمسافة معينة بحيث لا يؤدي إلى تسخين الوعاء jar. ما هو السيطرة لهذه التجربة؟

يجب أن يتماشى نبات السيطرة control مع نبات التجربة ولفترة ٢٤ ساعة بعدها تزال الأوراق لغرض إجراء اختبار فعالية التركيب الضوئي عليها على أساس تكوين النشا.

بعد تهيئة تجربتك لاحظ الجهاز المصمم من قبل المدرس (الشكل- ٦١). ما هو سبب وجود قدح من هيدروكسيد الباريوم $Ba(OH)_2$ داخل الناقوس الزجاجي Bell jar؟

ما هي السيطرة التي تستلزم الحاجة لها في هذه التجربة؟

لاستغلال الوقت فإن المدرس قد عمل اختباراً لفعالية التركيب الضوئي في أوراق نباتات التجربة والسيطرة. في أي حالة يكون اختبار النشا سالباً؟

إذا لم تتطابق نتائج تجربتك مع نتائج تجربة المدرس فما هي أسباب هذا الاختلاف.

٢- أخذ ثنائي اوكسيد الكاربون بواسطة النباتات المائية

يمكنك توضيح استخدام النبات لثنائي أوكسيد الكاربون في عملية التركيب الضوئي من خلال وضع نبات الأيلوديا *Elodea* في أنبوبة اختبار محتوية على كاشف كيمياوي chemical indicator يعمل على تغيير اللون بوجود ثنائي أوكسيد الكاربون أو انعدامه. فالفينول الأحمر phenol red يكون أحمر اللون في المحلول القلوي (القاعدي) alkaline solution واصفر في المحلول الحامض. وبالاستفادة من هذه المعلومات صمم تجربة مسيطر عليها توضح:

١- بأن نبات الأيلوديا يأخذ ثنائي أوكسيد الكاربون.

٢- بأن الضوء يؤثر على قابلية النبات على أخذ ثنائي أوكسيد الكاربون.

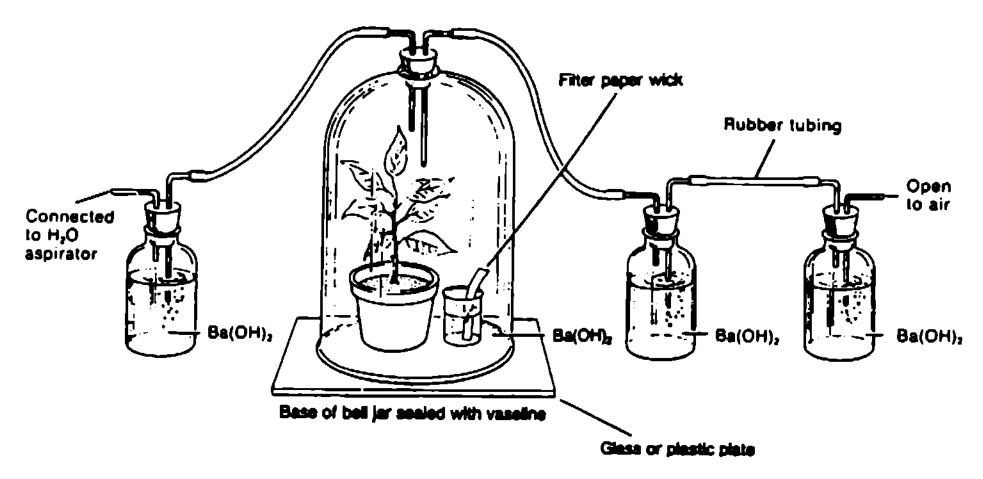
جـ - دور صبغات البلاستيدات الخضراء

إن وجود الطاقة ضروري لإدامة الحياة. وبالنسبة للخلايا فإن هذه الطاقة إما أن تكون طاقة ضوئية من الشمس أو طاقة كامنة potential energy مخزونة في الأواصر الكيمياوية. وإن الطاقة الضوئية التي هي نوع من الإشعاع الكهربائي المغناطيسي (الشكل- ٦٢) لابد أن تتحول أولاً إلى طاقة كيمياوية قبل أن تستفيد منها الخلايا الحية. ويحدث هذا التحول في خلايا النباتات الخضراء وإن الضوء الممتص هو الوحيد الذي يمكنه نقل طاقته، لذا فإن الأجزاء الملونة من الخلايا النباتية يجب أن تمتص الضوء المرئي visible light. وتدعى المواد التي لها القابلية الانتقائية على امتصاص الضوء بالصبغات pigments. وفي هذا الجزء من المختبر سيقوم كل طالب بالتعرف تجريبياً على أهمية الكلوروفيل chlorophyll في عملية التركيب الضوئي وكذلك تحديد طبيعة اللون الأخضر في النباتات وطيف الامتصاص absorption spectrum لمحلول صبغة البلاستيدات الخضراء.

١- حاجة الكلوروفيل لعملية التركيب الضوئي

١- خذ ورقة من نبات زهرة الغمد المرقش varigated *Coleus* وورقة من نبات إبرة الراعي ذو الورقة الفضية silver- leafed ارسم كل ورقة في الصف الأول من الجدول – ٢٣ موضحاً فيها توزيع الصبغات. وأن الصبغات البارزة هي صبغة الكلوروفيل الخضراء وصبغة الأنثوسيانين الحمراء red anthocyanin في ورقة نبات زهرة الغمد.

٢- ضع الأوراق leaves في قدح يحتوي على ماء بارد لبضع دقائق. بعدها اخرج الأوراق وسجل ملاحظاتك في الصف الثاني Row 2 من الجدول- ٢٣ أما بالرسوم drawing أو كتابة التعليقات.



شكل- ٦١: أهمية غاز ثنائي أوكسيد الكربون في عملية البناء الضوئي

الجدول- ٢٣: دور الكلوروفيل في التركيب الضوئي

الصف	المعاملة	الملاحظات	
		نبات زهرة الغمد	نبات إبرة الراعي ذو الورقة الفضية
١	ــــــــــــ		
٢	ماء بارد لبضع دقائق		
٣	ماء مغلي لبضع دقائق		
٤	كحول ساخن لبضع دقائق، ضع في طبق بتري مع اليود		

٣- انقل الأوراق إلى قدح يحتوي على ماء مغلي لبضع دقائق. اخرج الأوراق وسجل التغيرات في الجدول- ٢٣. فسر الاختلافات الملاحظة بين الصفين الثاني والثالث من الجدول- ٢٣.

٤- ضع الأوراق في كحول ساخن hot alcohol.

تحذير: سخن الكحول في قدح منفصل على لوحة ساخنة. ولا تسخن الكحول على مصباح بنزن.

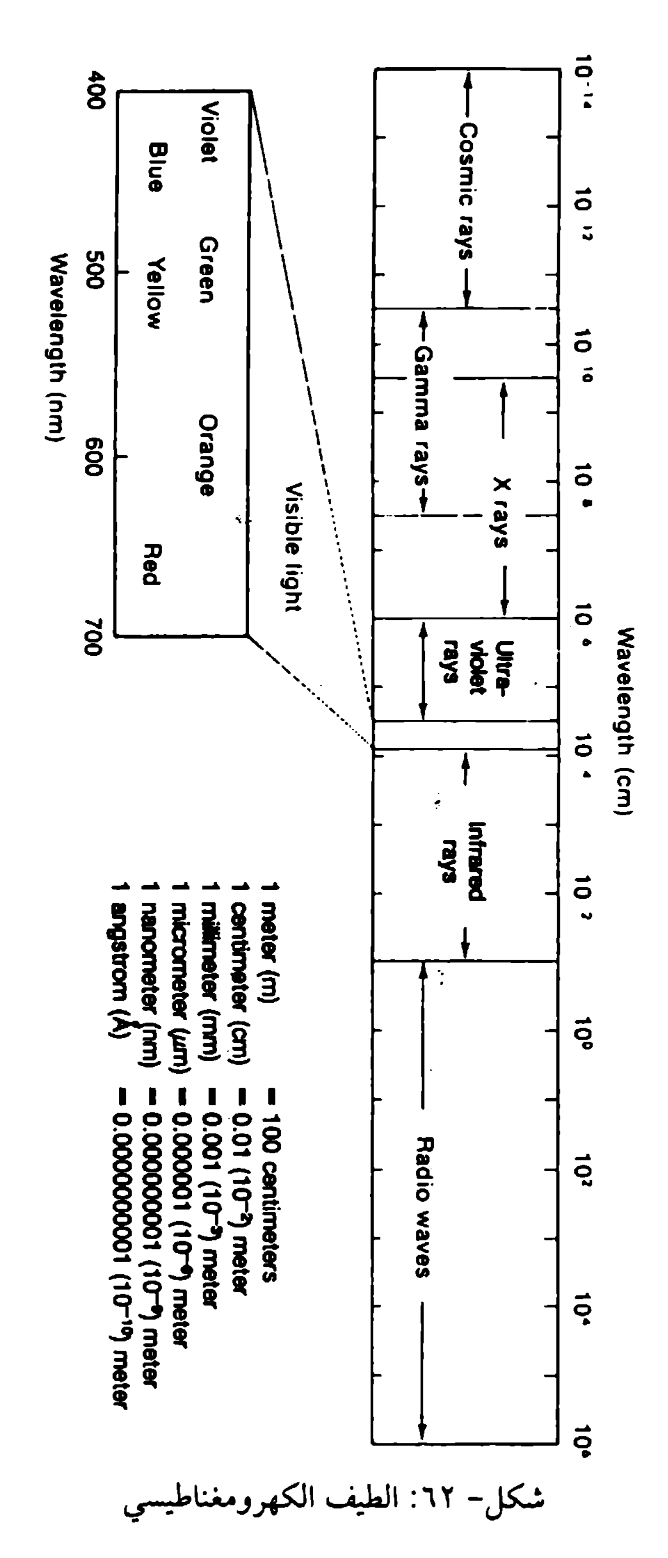
بعد بضع دقائق ستصبح الأوراق بيضاء. وفي هذه المرحلة انقل هذه الأوراق إلى طبق بتري يحتوي على اليود. امزج الطبق بلطف. حدد توزيع النشا في كل ورقة باستعمال الصف الرابع Row 4 من الجدول- ٢٣. كيف توضح هذه التجارب أهمية الكلوروفيل في عملية التركيب الضوئي؟

٢- عزل صبغات البلاستيدات الخضراء وتوصيفها

يمكن فصل مزيج معقد من المواد الكيمياوية بواسطة الكروماتوكرافي chromatography. وتستند عملية فصل المكونات في مزيج ما على الاختلافات في درجة ذوبانها solubilities في المذيبات solvents المختلفة. وفي هذه التجربة ستستخدم تقنية الكروماتوكرافي paper chromatography أو كروماتوكرافي الطبقة الرقيقة thin-layer chromatography لتحليل تركيب صبغة الكلوروفيل.

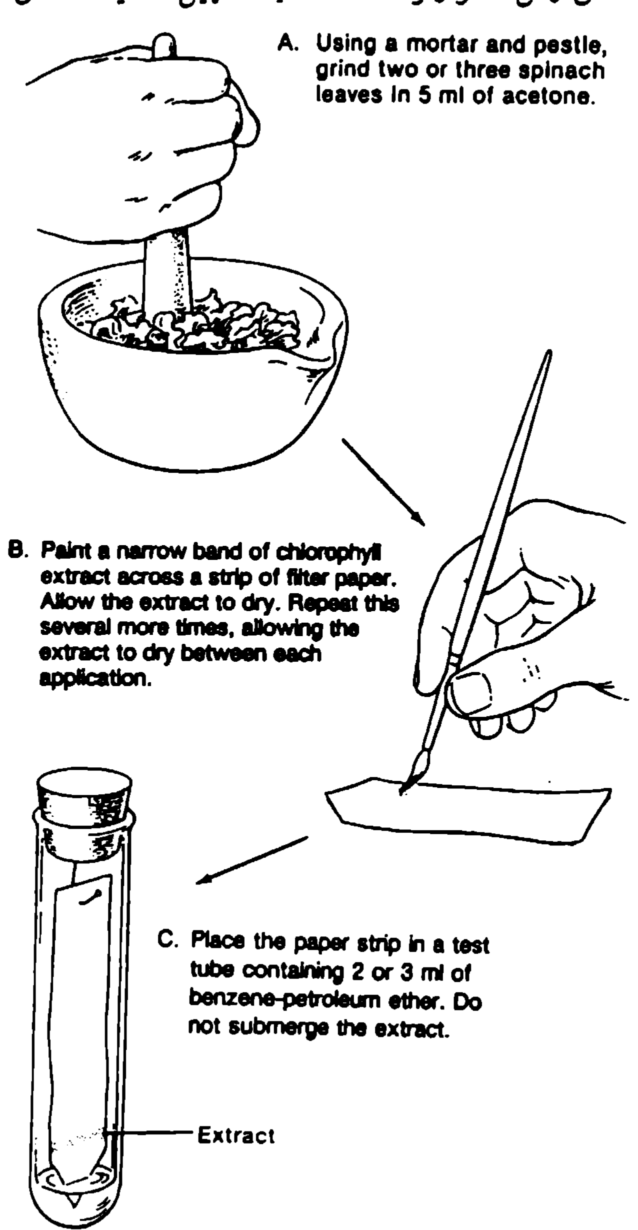
أ- الكروماتوكرافي الورقي:

يستعمل ورق الترشيح filter paper عادة في الكروماتوكرافي الورقي لفصل مكونات مزيج معين. إذ توضع كمية من المادة المراد فصلها عند إحدى نهايتي الورقة بشكل شريط أو خط streak. بعدها تغمر هذه النهاية في مذيب يعمل على فصل المزيج عند حركته إلى الأعلى ومروره ببقعة المزيج. وبعد تجفيف الورقة يمكنك ملاحظة المواد المفصولة مباشرة إذا كانت ملونة، او يمكنك رؤيتها من خلال استعمال الكواشف الرشاشة المختلفة spray reagents.



شكل- ٦٢: الطيف الكهرومغناطيسي

١- حضّر مستخلص الكلوروفيل من خلال سحق ٢-٣ أوراق سبانخ طرية fresh spinach leaves (ليست مجمدة) في ٥ مل من الأسيتون (الشكل- ٦٣). أضف كمية قليلة من رمل الكوارتز quartz sand لتسهيل عملية السحق.



شكل- ٦٣: طريقة فصل صبغة الكلوروفيل باستخدام الكروماتوغرافيا الورقي

٢- باستعمال فرشاة صبغ صغيرة ضع كمية قليلة من مستخلص الكلوروفيل على ورقة الترشيح بشكل شريط (الشكل- ٦٣). جفف الورقة أما بالنفخ عليها أو بحركتها في الهواء. ضع كمية أخرى من المستخلص وبما يعادل ٥- ٦ مرات الكمية الأولى. وجفف بعد كل إضافة.

٣- ضع شريط ورقة الترشيح في أنبوبة اختبار محتوية على البنزين والأثير البترولي benzene- petroleum ether كما موضح في الشكل- ٦٣ افحص خلال الدقائق اللاحقة المخطط اللوني (الكروماتوكرام) chromatogram ما هو الوقت الذي يستغرقه المذيب لكي يصل قمة الورقة؟ أعطِ وصفاً لعملية الفصل.

ب- كروماتوكرافي الطبقة الرقيقة

Thin-Layer Chromatography

يمكنك استعمال الصفائح التجارية المؤلفة من السيليكا جيل silica gel على ظهارة الخلات acetate backing لضمان تجانس سمك الإمتزاز adsorbent thickness. وتتميز هذه الصفائح sheets بإمكانية تقطيعها بالشكل والحجم المطلوبين. ومن ميزات كروماتوكرافي الطبقة الرقيقة هي السرعة التي بواسطتها تحدث عملية الفصل. إذ تحتاج عملية فصل مزيج كيماوي معقد بواسطة الكروماتوكرافي الورقي إلى ٢٤ ساعة، بينما نحتاج إلى ساعة فقط لفصل المزيج نفسه بكروماتوكرافي الطبقة الرقيقة.

١- ضع في وعاء الكروماتوكرافي chromatographic jar إلى ارتفاع ٠,٥ سم مذيب مكوّن من الأيسوكتين isooctane والأسيتون aceton والداي أثيل أيثر diethyl ether بنسب ٢:١:١. ضع الغطاء على الوعاء لكي يتشبع المحيط الداخلي للوعاء بأبخرة المذيب (الشكل- ٦٤).

٢- باستعمال أنبوبة الهيماتوكرت الشعرية capillary hematocrit tube ضع بضع قطرات من المستخلص السابق للكلوروبلاست بشكل بقعة spot بمسافة ٢ سم عن أسفل الصفيحة. وحاول أن تجعل قطر البقعة ٣ أو ٤ ملم. جفف السيليكا جيل بعد كل إضافة.

٣- ادخل الكروماتوكرام في الوعاءوضع الغطاء. اترك الوعاء لحين وصول المذيب إلى الأعلى بمسافة ٢ سم عن قمة الصفيحة ما هو الوقت الذي تستغرقه عملية فصل الصبغات باستعمال طريقة كروماتوكرافي الطبقة الرقيقة مقارنة بطريقة الكروماتوكرافي الورقي؟

٤- أطياف امتصاص صبغات البلاستيدات الخضراء

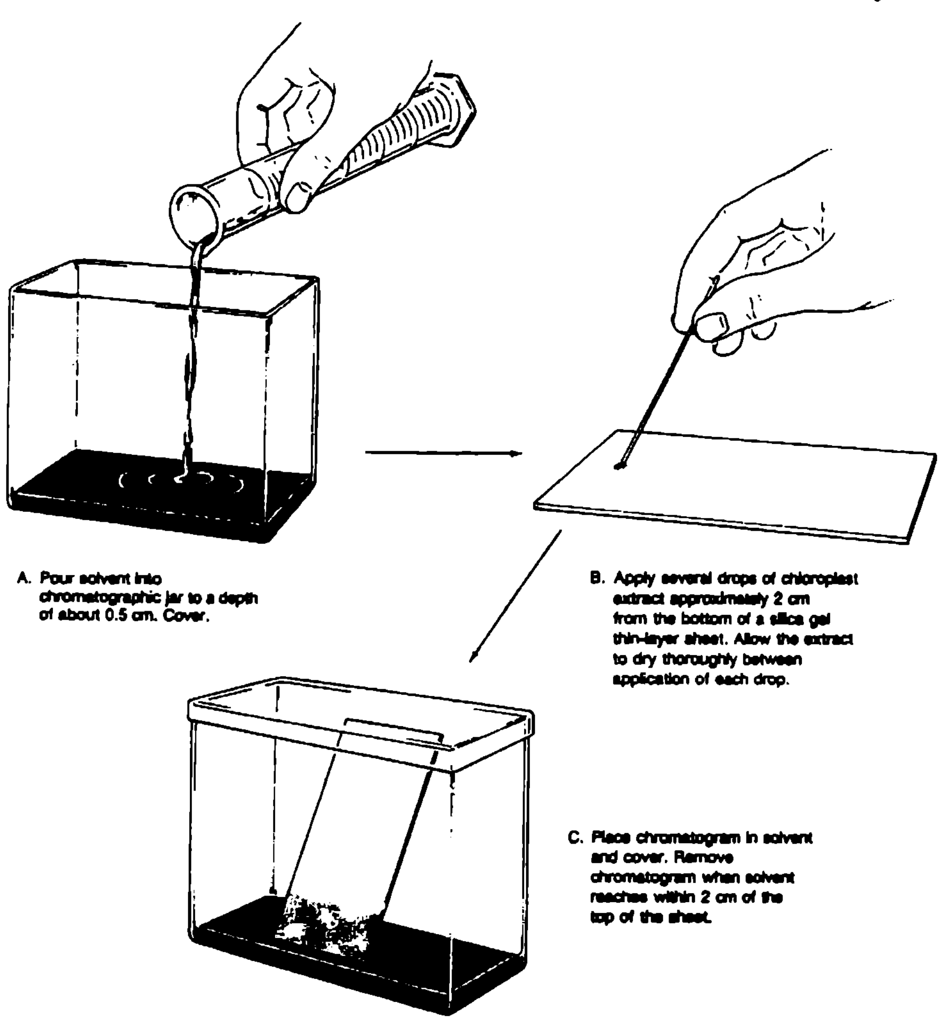
يمكن تعيين الأطوال الموجية wave lengths للطيف المرئي visible spectrum الممتصة بواسطة صبغات البلاستيدات الخضراء من خلال استعمال المطياف spectroscope (الشكل- ٦٥). ففي هذا الجهاز يتشتت الضوء المرئي إلى مكوناته الطيفية (الشكل- ٦٥) من خلال صفيحة صقلية polished plate ذات خطوط بمسافات متقابلة حيث تسقط حزم المكونات الطيفية على مقياس scale. وأن اختفاء الألوان المختلفة (الأطوال الموجية) من الطيف spectrum عند مرور الضوء في محلول صبغي يشير إلى أن هذه الطوال الموجية قد تم امتصاصها بواسطة الصبغات. ويدعى المخطط البياني الذي يمثل العلاقة بين كمية الضوء التي تمتصها المادة والطول الموجي للضوء باسم طيف الامتصاص absorption spectrum.

ويوضح الشكل-٦٦ طيف الامتصاص لمادة افتراضية hypothetical substance ما هي الأطوال الموجية التي تمتصها بشدة هذه المادة الافتراضية؟ وفي التجربة الآتية ستقوم بتحديد طيف امتصاص البلاستيدات الخضراء باستعمال طريقتين مختلفتين.

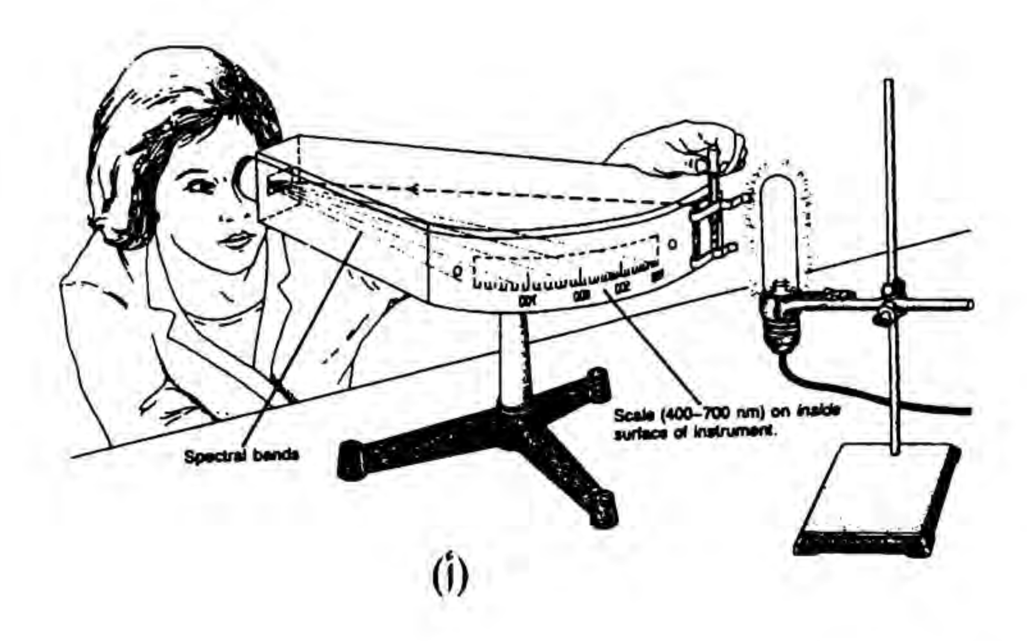
أ- الطريقة الأولى: التعيين المطيافي Spectroscopic Determination

ضع عينة من مستخلص البلاستيدات الخضراء المتوفر في أنبوبة اختبار صغيرة وسيساعدك المدرس في استعمال المطياف لغرض تعيين طيف امتصاص المستخلص. وفي الجهاز المستعمل في هذا المجال فإن هناك طيفين spectras سيسقطان على المقياس (٤٠٠- ٧٠٠ نانومتر) الموجود على السطح الداخلي الظهري للجهاز. إذ يظهر الطيف المرجعي العلوي upper reference spectrum الألوان المختلفة (الأطوال الموجية) للضوء.

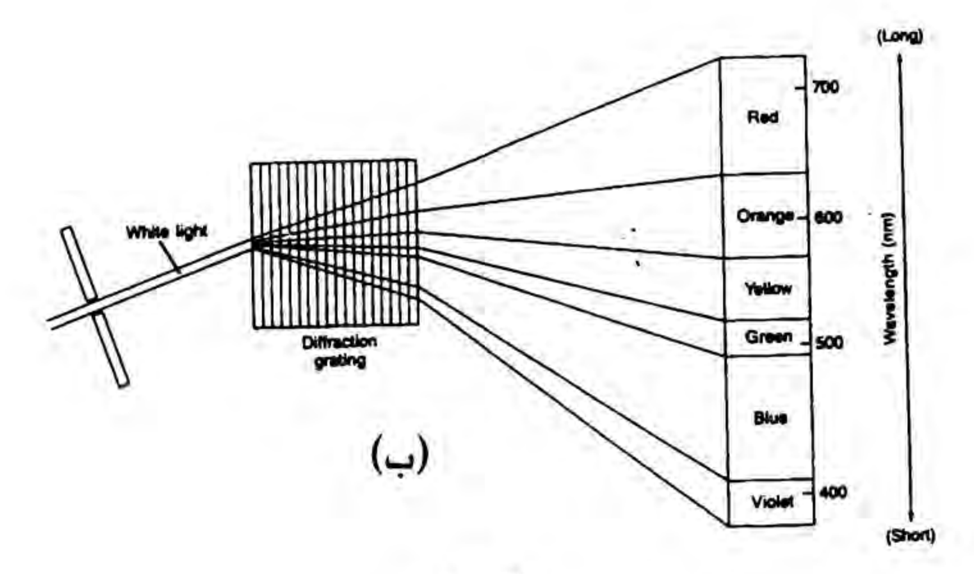
أما طيف العينة السفلي فينشأ نتيجة لمرور الضوء خلال العينـة sample. وضّـح في الجدول – ٢٤ الأطوال الموجية للضوء الممتصة واسـطة مسـتخلص البلاسـتيدات الخضراء.



شكل- ٦٤: طريقة الكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة thin layer chramatography لصبغات البلاستيدات الخضراء chloroplasts



(أ)

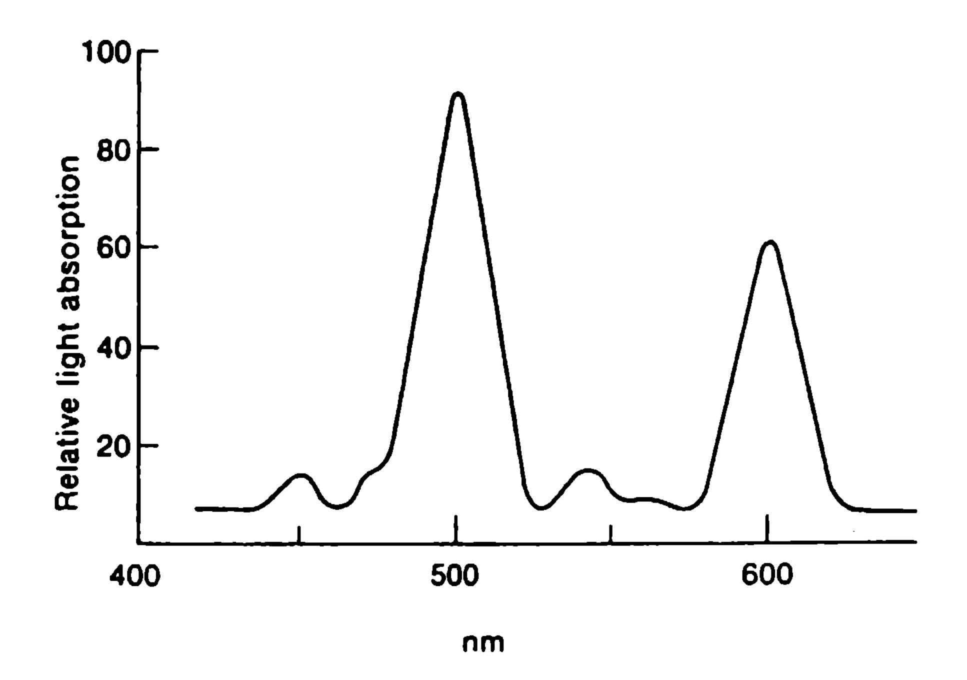


(ب)

شكل- ٦٥:

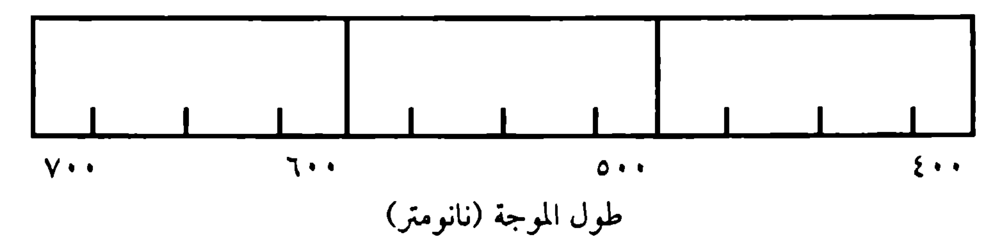
(أ) تقدير طيف الامتصاص absorption spectrum لصبغات البلاستيدات الخضراء بطريقة spectroscope.

(ب) انتشار الضوء الأبيض بواسطة diffraction grating



شكل- ٦٦: طيف الامتصاص البسيط simple absorption spectrum

الجدول – ٢٤. الأطوال الموجية للضوء بواسطة مستخلص الكلوروفيل



ب- الطريقة الثانية: التعيين الضوئي الطيفي
Spectrophotometric Determination

يستعمل في هذه الطريقة المقياس اللوني ملتون روي سبكترونيك ٢٠ لتعيين طيف الامتصاص لصبغات البلاستيدات الخضراء وبصورة أكثر دقة.

١- حضّر الجهاز عند طول موجي ٤٠٠ نانومتر ثم اعمل الكفيء blank باستعمال مذيب الأسيتون والإيثانول acetone- ethanol solvent المستخدم في استخلاص

صبغات البلاستيدات الخضراء. لماذا يستعمل هذا المذيب بوصفة كفيء blank لجهاز المقياس الضوئي spectrophotoneter؟

٢- ضع الأنبوبة المحتوية على المستخلص في حامل العينة sample holder وعين النسبة المئوية للنفاذية percent transmittance.

٣- ارفع العينة وثبت الطول الموجي على ٢٥ نانومتر. حاول تصفير الجهاز باستعمال الكفيء وبنفاذية صفر ٪ و ١٠٠٪، ثم عين النسبة المئوية للنفاذية للعينة.

٤- كرر الخطوة ٣ وبفواصل أطوال موجية ٢٥ نانومتر. ومن الضروري إدخال فلتر إضافي أحمر (مرشح أحمر) red filter وأنبوب ضوئي حساس للون الأحمر red-sensitive phototube لغرض التعيين عند طول مورجي أكثر من ٦٢٥ نانومتر.

٥- حوّل النسبة المئوية للنفاذية (T٪) إلى امتصاصية (A) absorbance باستعمال الجدول – ٢٥، ثم ارسم مخطط بياني في أي طول موجي أو أطوال موجيه يمتص مستخلص الكلوروفيل بأقصى ما يمكن؟

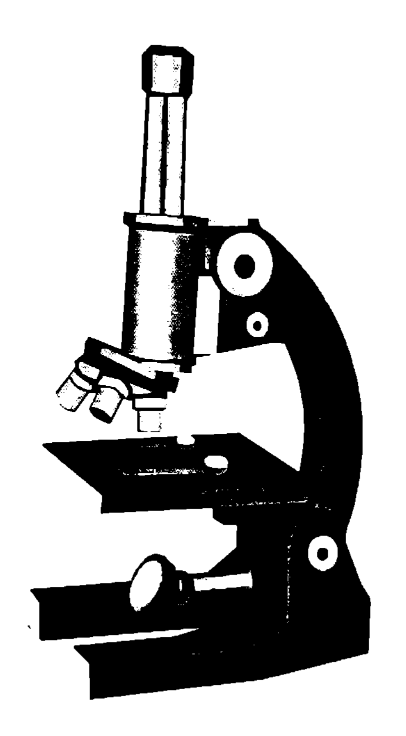
لماذا تظهر أوراق هذه النباتات التي يكون فيها الكلوروفيل هو السائد بشكل أخضر؟

تتألف صبغات البلاستيدات الخضراء من الكلوروفيلات chlorophylls وشبيهات الكروتين carotenoids، لذا لا يمكن معرفة أي الصبغات تمتص أي أطوال موجية من خلال طيف الامتصاص. كيف يمكنك تعيين ذلك؟

%T	Absorbance (A)				%T	Absorbance (A)			
	1 (.00)	2 (.25)	3 (.50)	4 (.75)		1 (.00)	2 (.25)	3 (.50)	4 (.75)
1	2.000	1.903	1.824	1.757	51	.2924	.2903	.2882	.2861
2	1.699	1.648	1.602	1.561	52	.2840	.2819	.2798	.2777
3	1.523	1.488	1.456	1.426	53	.2756	.2736	.2716	.2696
4	1.398	1.372	1.347	1.323	54	.2676	.2656	.2636	.2616
5	1.301	1.280	1.260	1.240	55	.2596	.2577	.2557	.2537
6	1.222	1.204	1.187	1.171	56	.2518	.2499	.2480	.2460
7	1.155	1.140	1.126	1.112	57	.2441	.2422	.2403	.2384
8	1.097	1.083	1.071	1.059	58	.2366	.2347	.2328	.2310
9	1.046	1.034	1.022	1.011	59	.2291	.2273	.2255	.2236
10	1.000	.989	.979	.969	60	.2218	.2200	.2182	.2164
11	.959	.949	.939	.930	61	.2147	.2129	.2111	.2093
12	.921	.912	.903	.894	62	.2076	.2059	.2041	.2024
13	.886	.878	.870	.862	63	.2007	.1990	.1973	.1956
14	.854	.846	.838	.831	64	.1939	.1922	.1905	.1888
15	.824	.817	.810	.803	65	.1871	.1855	.1838	.1821
16	.796	.789	.782	.776	66	.1805	.1788	.1772	.1756
17	.770	.763	.757	.751	67	.1739	.1723	.1707	.1691
18	.745	.739	.733	.727	68	.1675	.1659	.1643	.1627
19	.721	.716	.710	.704	69	.1612	.1596	.1580	.1565
20	.699	.694	.688	.683	70	.1549	.1534	.1518	.1503
21	.678	.673	.668	.663	71	.1487	.1472	.1457	.1442
22	.658	.653	.648	.643	72	.1427	.1412	.1397	.1382
23	.638	.634	.629	.624	73	.1367	.1352	.1337	.1322
24	.620	.615	.611	.606	74	.1308	.1293	.1278	.1264
25	.602	.598	.594	.589	75	.1249	.1235	.1221	.1206
26	.585	.581	.577	.573	76	.1192	.1177	.1163	.1149
27	.569	.565	.561	.557	77	.1135	.1121	.1107	.1093
28	.553	.549	.545	.542	78	.1079	.1065	.1051	.1037
29	.538	.534	.530	.527	79	.1024	.1010	.0996	.0982
30	.532	.520	.516	.512	80	.0969	.0955	.0942	.0928
31	.509	.505	.502	.498	81	.0915	.0901	.0888	.0875
32	.495	.491	.488	.485	82	.0862	.0848	.0835	.0822
33	.482	.478	.475	.472	83	.0809	.0796	.0783	.0770
34	.469	.465	.462	.459	84	.0757	.0744	.0731	.0718
35	.456	.453	.450	.447	85	.0706	.0693	.0680	.0667
36	.444	.441	.438	.435	86	.0655	.0642	.0630	.0617
37	.432	.429	.426	.423	87	.0605	.0593	.0580	.0568
38	.420	.417	.414	.412	88	.0555	.0543	.0531	.0518
39	.409	.406	.403	.401	89	.0505	.0494	.0482	.0470
40	.398	.395	.392	.390	90	.0458	.0446	.0434	.0422
41	.387	.385	.382	.380	91	.0410	.0398	.0386	.0374
42	.377	.374	.372	.369	92	.0362	.0351	.0339	.0327
43	.367	.364	.362	.359	93	.0315	.0304	.0292	.0281
44	.357	.354	.352	.349	94	.0269	.0257	.0246	.0235
45	.347	.344	.342	.340	95	.0223	.0212	.0200	.0188
46	.337	.335	.332	.330	96	.0177	.0166	.0155	.0144
47	.328	.325	.323	.321	97	.0132	.0121	.0110	.0099
48	.319	.317	.314	.312	98	.0088	.0077	.0066	.0055
49	.310	.308	.305	.303	99	.0044	.0033	.0022	.0011
50	.301	.299	.297	.295	100	.0000	.0000	.0000	.0000

Note: Intermediate values can be arrived at by using the .25, .50, and .75 columns. For example, if % *T* equals 85, the absorbance equals .0706; if % *T* equals 85.75, the absorbance equals .0667.

جدول- ٢٥: تحويل النسبة المئوية transmittance إلى absorbance



المختبر العاشر

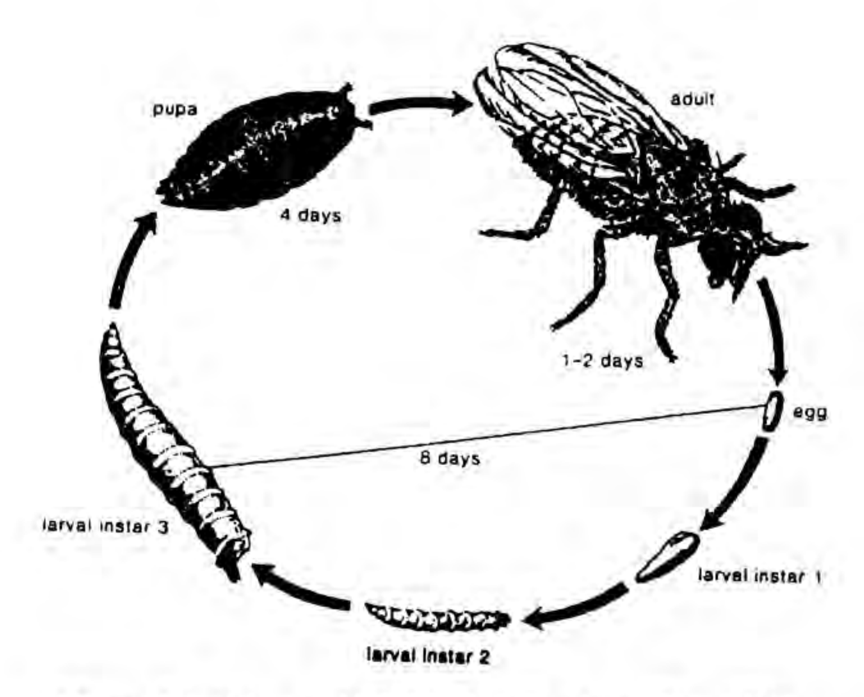
الوراثــــة المندليــــة

Mendelian Genetics

لقد استندت الوراثة الحديثة ومعظم نظرية التطور المعاصرة على الأدلة التجريبية التي وضعها كريكور مندل Gregor Mendel. إذ أدت دراسات مندل حول الصفات المتوارثة لنبات ابزاليا الحلوة sweet pea إلى اكتشاف قوانين الانعزال Law of Segregation والتوزيع الحر Law of Independent Assortment . وفي هذا الجزء من المختبر ستتعرف على هذه القوانين من خلال التهجينات أحادية الهجين monohybrid وثنائية الهجين dihybrid . ويمكن استخدام العديد من الكائنات الحية لدراسة قوانين مندل. وسوف تقوم بدراسة ذبابة الفاكهة fruit fly المسماة دروسوفيلا Drosophila والذرة maize (corn) التي تمثل الكائنات الحية حقيقة النواة والتي تجمع عنها المزيد من المعلومات الوراثية. وقبل البدء بهذه الدراسات لابد من قراءة الملحق s المتعلق بقوانين مندل الوراثية.

أ- الدراسات الوراثية باستخدام الدروسوفيلا

تعد ذبابة الفاكهة دروسوفيلا ميلانوكاستر *Drosophila melanogaster* إحدى الكائنات الحية المستعملة على نطاق واسع في الدراسات الوراثية. إذ أنها تتكاثر بسهولة، وتتراوح الفترة الزمنية للجيل generation time حوالي ٩ أو ١٠ أيام بدرجة حرارة المختبر (٢٥ م). ونظراً لصغر حجم الدروسوفيلا فإن مزرعتها cutture تحتل حيزاً صغيراً لذا يمكن التعامل معها بوصفها كائناً حياً مناسباً وغير مكلفاً. وقد عرفت الدروسوفيلا وراثياً بالنمط البري wild-type (الطبيعي narmal) ويمكن الحصول على سلالات طافرة mutant strains في الدروسوفيلا بسهولة. وقد لوحظ وجود أعداد كبيرة من الطفرات الذاتية في هذه الذبابة، فضلاً عن إمكانية احداث طفرات mutations أخرى بواسطة الإشعاع radiation، لذا فقد أصبحت هذه الذبابة مجال بحث للتهجين الوراثي.



شكل- ٦٧: دورة حياة ذبابة الفاكهة (الدروسوفيلا *Drosophila*)

١- فحص النمط البري للدروسوفيلا

Examination of Wild- type *Drosophila*

ستتعرف في هذا الجزء من المختبر على خصائص النمط البري وبعض السلالات الطافرة الشائعة للدروسوفيلا. وسوف يتم إعطائك عدداً من هذه الذبابات لكي تتعرف على الصفات الطافرة mutant traits فيها. ويمكنك الحصول على قنينة vial من المدرس تحتوي على النمط البري لذبابة الفاكهة، حيث تقوم بتخديرها بالأثير باتباع الطريقة الموضحة في الشكل-٦٨. وعندما يتوقف جميع الذباب عن الحركة حوله إلى ورقة بيضاء وافحصه بدقة باستعمال المجهر الستيريوسكوبي أو العدسة اليدوية hand lens. تعرف على خصائص الذكر والأنثى (الشكل-٦٩) وسجل الملاحظات في الجدول-٢٦.

جدول- ٢٦: مقارنة بين ذكر وأنثى ذبابة الفاكهة

الصفة	الملاحظة	
	الذكر	الأنثى
أيهما أكبر في الحجم العام		
ما هو الاختلاف في التخطيط الموجود على البطن		
ما هو شكل قمة البطن		
هل الأمشاط الجنسية موجودة أو معدومة		

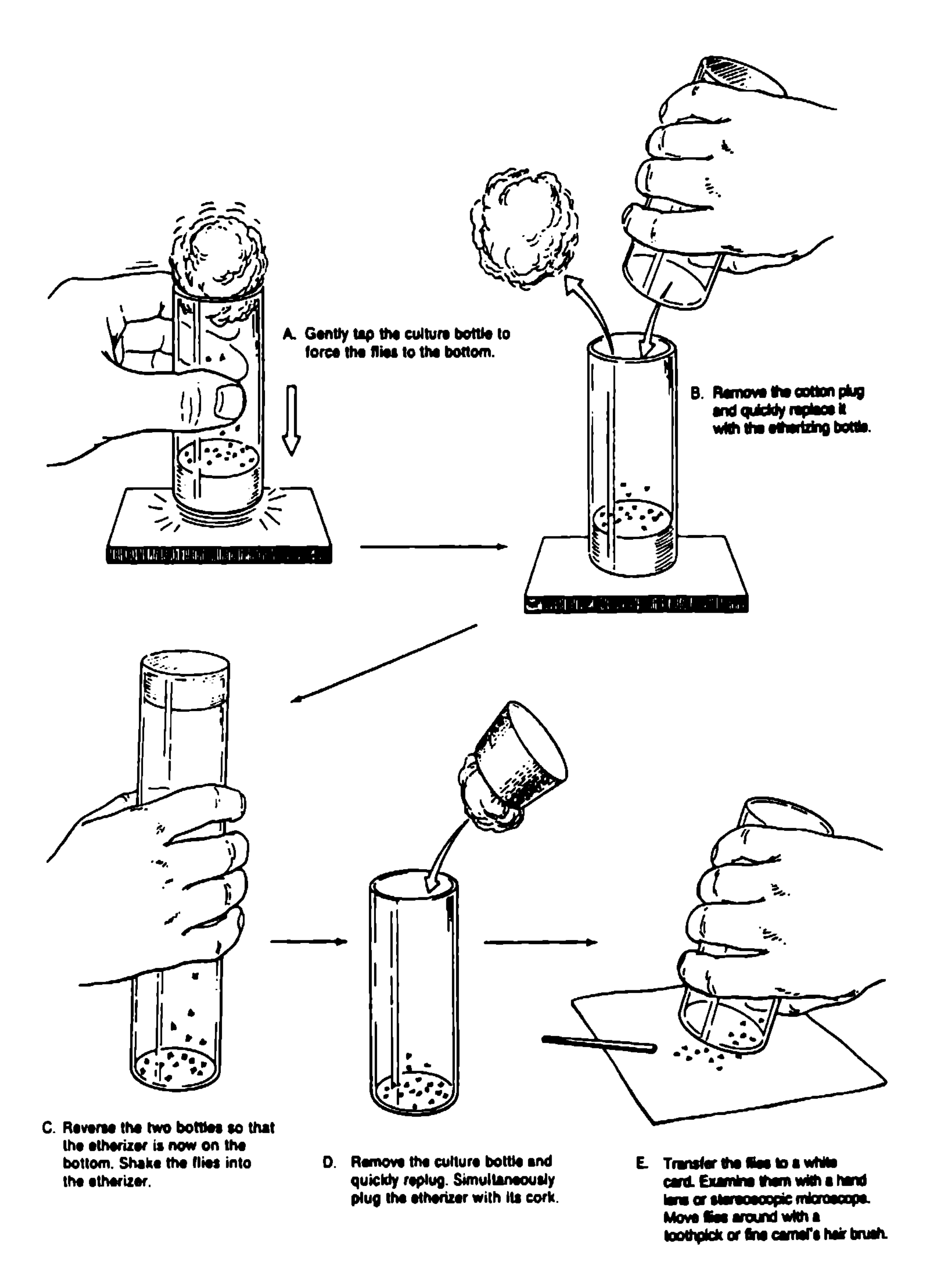
حاول الحصول من المدرس على قناني مرقمة محتوية على مزيج من الذباب الطافر وكما يأتي:

الذبابة الطافرة أثرية الجناح vestigial wing mutant والتي تتميز بأجنحتها المختزلة.

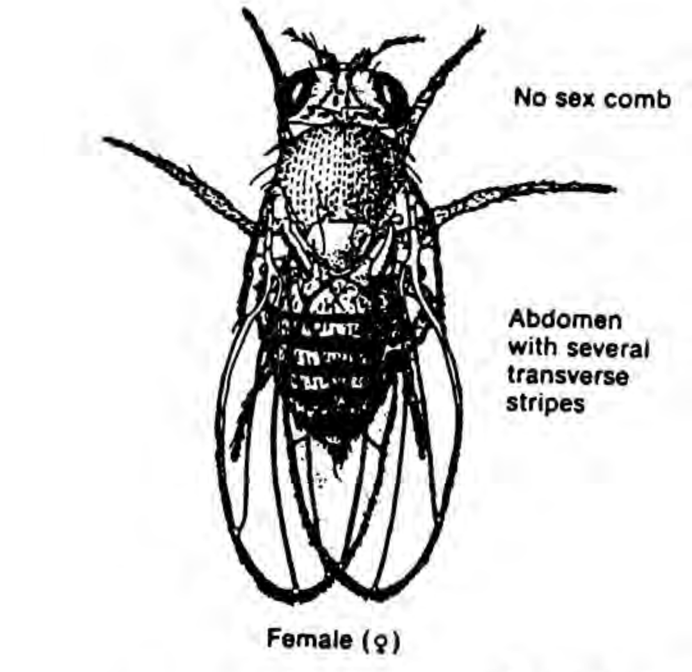
الذبابة الطافرة البيضاء white mutant التي تظهر عيونها بشكل أبيض.

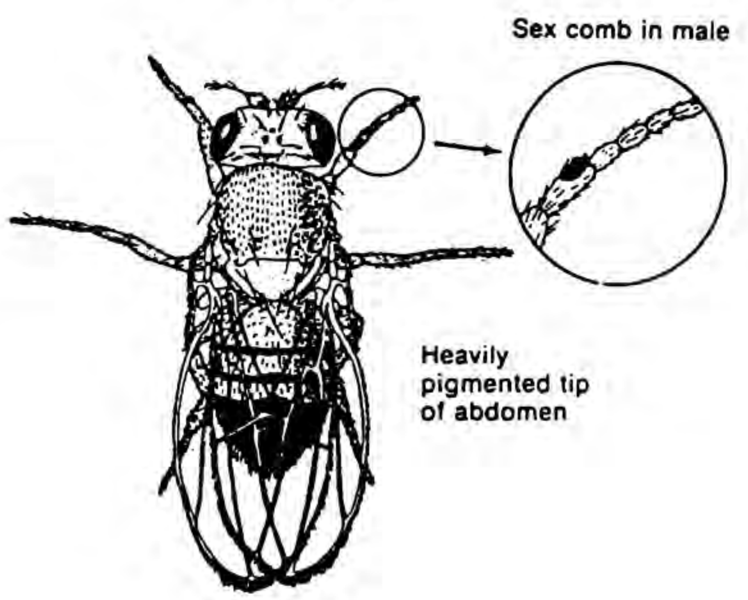
الذبابة الطافرة ذات العين القضيبية bar eye mutant التي يقل فيها عدد العدسات القرنية facetas للعين مما يعطيها المظهر القضيبي أسفل منتصف العين.

الذبابة الطافرة السوداء black mutant التي يكون لون جسمها أسود.



شكل- ٦٨: طريقة تخدير ذباب الفاكهة.





شكل- ٦٩ : ذبابة الفاكهة البالغة *Drosophila melanogaster*

خدر الذباب بالإيثر وحدد طبيعة الذباب الطافر في القنينة الخاصة بك ثم سجل ملاحظاتك في الجدول- ٢٧ حول الذباب الطافر المجهول unknown.

الجدول –٢٧: الذباب الطافر المجهول

الطفرة	الجنس

٢- التهجين الوراثي التجريبي Experimental Genetic Crosses

لعمل مثل هذه التضريبات الوراثية سيتم تجهيز كل طالب بأصول معروفة النسب pedigreed stocks تحمل جينات طافرة، حيث تمت المحافظة على استمرارية هذه الأصول في المختبر، ويتناسل الذباب فيما بينه في هذه المزارع cultures. وسوف يستعمل علامات للأصول المتناسلة تشير إلى جين أو جينات طافرة معينة تحملها هذه الأصول stocks. فالذباب الذي يظهر الصفات القياسية أو الطبيعية يشار إليه بالنمط البري wild type.

* تشير العلامة الموجبة (+) إلى جين أو أليل allele النمط البري.

* يشير الحرف الصغير lower- case letter إلى أن الأليل الطافر mutant allele يكون متنحياً recessive بالنسبة لأليل النمط البري wild- type allele. فالرمز e مثلاً يمثل الأليل الطافر المتنحي للون الجسم الأسود ebony body color، بينما يمثل الرمز e+ الأليل السائد dominant allele للون النمط البري الرمادي البني gray- brown.

* أن النمط الوراثي للذباب الأسود متماثل الزيجات homozygous هـو ee ، بينمـا يكون الـنمط الـوراثي للـذباب متماثـل الزيجـات ذو الـنمط الـبري $e^+ e^+$ عنـد تضريب سلالتين مـن ذبـاب الفاكهـة يجـب عليـك الأخـذ بنظـر الاعتبـار تلـك الصفات التي يختلف الأباء فيها (جيـل الأبـاء الأول parental generation) فمـثلاً عن تضريب ذبابة أثرية الجناح مع ذبابة ذات عيون بنية داكنة sepia eyes لابد من ملاحظة شكل الجناح ولون العين بدقة.

ب- قانون مندل للانعزال Mendels Law of Segregation:

إستناداً لقانون مندل للانعزال فإن الجينات لا تمتزج مع بعضها بل أنها تتصرف بشكل وحدات مستقلة. حيث أنها تنتقل بشكل وحدات كاملة من جيل لآخر وإنها قد تؤدي أو لا تؤدي إلى إظهار صفات مظهرية وهذا يعتمد على سيادة تلك الصفة. فضلاً عن ذلك فإن الجينات تنعزل بشكل عشوائي مؤدية إلى ظهور نسب معينة مـن الصفات التي يمكن التنبؤ بها في الجيل الناتج.

١ - في الدروسوفيلا *Drosophila*:

سيحاول كل طالب الآن إجراء عدد من محاولات التضريب أو التزاوج mating لتوضيح قانون مندل للانعزال، ويتم ذلـك إمـا مـن خـلال التزاوجـات المقترحـة في الجدول- ٢٨ أو من خلال التزاوجات التي يقترحها عليك المدرس. وفي حالـة عـدم وجود الوقت الكافي فإن المدرس قد هيأ لك التزاوجات الضـرورية. وإذا رغبـت في إجراء تزاوجات معينة فإن المدرس سيوفر لك المزارع المناسـبة. وعنـدما تعمـل هـذه التزاوجات أكمل المعلومات المؤشرة في الجدول- ٢٩.

إعزل ذكر مخدر بالإيثر etherized male من أحد السـلالات وأنثى عذراء مخـدرة بالإيثر من سلالة أخرى. وفي الوقت الذي تمسـك فيـه قنينـة المزرعـة culture bottle ضع هذا الذباب في القنينة. وتأكد من إضافة بعض حبيبات الخميرة الجافة أو محلـول الخميرة المعلق yeast suspension إلى الوسط medium قبل إدخال الذباب إلى القنينـة. ضع القنينة على أحد جوانبها لإستعادة وضع الـذباب مـن عمليـة التخـدير بـالإيثر

ولمنع التصاقه بالوسط الغذائي الموجود في القنينة. وبعد سبعة أو ثمانية أيام أخرج الأباء من القنينة. وسيبدأ ذباب الجيل الأول first filial generation (F_1) بالظهور بعد حوالي ١٠ أيام من التزاوج mating. وبعد ظهور أعداد من ذباب الجيل الأول F_1 flies، خدر الإناث وسجل الأنماط المظهرية phenotypes في الجدول-٢٩. وللحصول على الجيل الثاني F_2 generation حاول اختبار ثلاث ذكور وثلاث إناث من ذباب الجيل الأول وضعهم في قنينة جديدة حاوية على الوسط الغذائي medium باستعمال طريقة التزاوج المذكورة سابقاً في التزاوج الأول، وليس من الضروري أن تكون إناث الجيل الأول من العذارى لإغراض هذا التزاوج. لماذا ؟

الجدول- ٢٨: التزاوجات المقترحة

جيل الآباء (P_1)		
الأنثى ♀	×	الذكر ♂
لون العين بني داكن (se)	×	النمط البري (لون العين أحمر)
أجنحة قصيرة (dp)	×	النمط البري (أجنحة طويلة)
أجنحة أثرية (vg)	×	النمط البري (أجنحة طويلة)
لون الجسم أسود (e)	×	النمط البري (لون الجسم رمادي بني)

بعد مرور سبعة ـ ثمانية أيام أخرج ذباب الجيل الأول من القنينة. وبعد اليوم الرابع عشر من التزاوج خدر ذباب الجيل الثاني F_2 flies ثم أعزل الذكور عن الإناث، وسجل الأنماط المظهرية في الجدول- ٢٩. ثم سجل نتائج تضريب أو تزاوج الجيل الثاني الذي قمت بإجرائه من خلال إدخال الأنماط الوراثية للآباء والجيل الأول والثاني. ومن هذه النتائج حدد نسبة الأنماط المظهرية phenotypic ratio التي حصلت عليها.

ما هي الصفة trait السائدة في التضريبات التي قمت بها؟

الجدول- ٢٩: التضريبات أحادية الهجين في الدروسوفيلا

_______________ X _______________   _______________

اسم الطالب   الأنثى (P_1)   الذكر (P_1)

تاريخ تزواج الآباء ________ تاريخ فصل الآباء ________

النمط المظهري لإناث الجيل الأول ____ النمط المظهري لذكور الجيل الأول ____

_______________ X _______________   _______________

أنثى الجيل الأول   ذكر الجيل الأول   تاريخ تزواج الجيل الأول

تاريخ فصل الجيل الأول ________ تاريخ فحص الجيل الأول ________

ذكور الجيل الثاني		إناث الجيل الثاني	
الأنماط المظهرية للجيل الثاني	العدد	الأنماط المظهرية للجيل الثاني	العدد
المجموع =		المجموع =	

	الذكر	الأنثى
النمط الوراثي للآباء	________	________
النمط الوراثي للجيل الأول	________	________
النمط الوراثي للجيل الثاني	________	________
	________	________
	________	________

تحليل مربع- كاي لنتائج الدروسوفيلا

عند قيام كل طالب بإجراء تضريبات تتضمن زوج واحد أو أكثر من الأليلات فإنه يمكن التنبوء بالنتائج. فمثلاً عند قيام كل طالب بإجراء التضريبات الافتراضية الآتية فمن المتوقع أن تكون نسبة النمط المظهري أحادي الهجين ٣:١ في الجيل الثاني:

(الآباء) P_1 : AA X aa

(الجيل الأول) F_1 : Aa

F_1 : Aa X Aa

(الجيل الثاني) F_2 : AA Aa aa

نسبة الأنماط الوراثية 1 : 2 : 1

نسبة الأنماط المظهرية 3 : 1

ويمكن التنبؤ بالنتيجة نفسها عند إجراء تضريب ثنائي الهجين dihybrid إذ يتوقع أن تكون نسبة الأنماط المظهرية ٩: ٣: ٣: ١. وتمثل هذه النسب المتوقعة expected. أما في الحالة الطبيعية للكائنات الحية فمن النادر أن تكون النسب المتوقعة مماثلة للنسب التجريبية أو الملاحظة experimental or observed ratios عند حساب عدد الأفراد على أساس الصفات المظهرية. وأن الغرض من اختبار مربع – كاي هو لتحديد فيما إذا كانت النتائج الملاحظة observed data هي مقاربة للنتائج المتوقعة لنسبة معينة . أي أن هذا الاختبار يحدد فيما إذا كانت الانحرافات deviations عن القيم المتوقعة هي نتيجة لشيء آخر وليس الصدفة.

استعمل الأرقام الخاصة بنسب الجيل الثاني F_2 ratios في الجدول – ٢٩ لإجراء تحليل مربع- كاي لغرض تحديد فيما إذا كانت النسب الملاحظة تتفق مع النسب المتوقعة وبذلك تعزز النسبة المظهرية أحادية الهجين ٣:١ . سجل النتائج في الجدول

– ٣٠. هل أن النسب الملاحظة هي صغيرة إلى الحد الذي تقع فيه ضمن الحدود المتوقعة بواسطة الصدفة فقط؟ وإذا لم تكن كذلك ما هي العوامل الأخرى من غير الصدفة التي يمكن أن تفسر الانحرافات الكبيرة للنسب الملاحظة عن تلك النسب التي تتوقع الحصول عليها؟

الجدول–٣٠: نتائج تحليل مربع- كاي للتضريب أحادي الهجين في الدروسوفيلا

النمط المظهري	النمط الوراثي	الملاحظ	المتوقع	الملاحظ- المتوقع	(الملاحظ – المتوقع)^{2}	(الملاحظ – المتوقع)^{2} / المتوقع
المجموع						
الاستنتاج:						

٣- في الذرة

سوف يعطي المدرس كل طالب بذور الجيل الأول من الذرة F_1 corn seeds والتي عند زراعتها ستعطي نباتات الجيل الثاني والتي سيكون بعضها طبيعيا والبعض الآخر مصاباً بنقص ما. وسوف يعلم المدرس كيفية زراعة هذه البذور واسقائها بالماء. وتحتاج البادرات seedlings (النبتات الصغيرات) إلى ٧– ١٠ أيام لكي تخرج من التربة. وعندما يصل طول هذه النبتات الصغيرات إلى ٥٠– ٧٥ ملم احسب أعداد كل من نوعي النبتات الصغيرات في الصينية tray الخاصة بك وتلك الخاصة ببقية طلبة الصف. ويمكنك استعمال الرموز المناسبة لتمييز اليل واحد allel عن اليل allel آخر. هيأ الجداول المناسبة وضع الأرقام فيها.

ما هو النقص الذي يعبر عنه أحد الايلين؟

ما هي نسبة الجيل الثاني التي حصلت عليها؟

هل أن النسبة التي حصلت عليها مماثلة للنسبة الخاصة بنباتات طلبة الصف أو مختلفة عنها؟ وضح فيما إذا كانت هناك اختلافات.

ما هي الأنماط المظهرية التي ظهرت في الجيل الثاني؟

ما هي الأنماط الوراثية في الجيل الثاني؟

ماذا يمكن أن تكون الأنماط المظهرية والوراثية للجيل الأول؟

ماذا يمكن أن تكون الأنماط المظهرية والوراثية للآباء (جيل الآباء P_1 generation)؟

هل لابد أن يكون الآباء ناضجين جنسياً لكي يتم التعبير عن كل صفة في الجيل الثاني F_2 generation؟ وضح ذلك.

حلل نتائجك باستعمال اختبار مربع- كاي. هل أن نتائج التجريبية تتماشي مع ما تتوقع الحصول عليه؟ وإذا لم تكن كذلك فلماذا هذا الانحراف عن المتوقع؟

جـ - قانون مندل للتوزيع الحر

Mendel's Law of Independent Assortment

لقد وضع مندل قانونه للتوزيع الحر من خلال دراساته المتضمنة التضريب crosses بين زوجين من الجينات. حيث أوضح بأنه عند التعامل مع اليل واحد او اثنين أو ثلاثة أو أكثر فإن كل واحد منهم يعمل بصورة مستقلة عن بقية الأليلات، وإن هذه الأليلات لا تتغير عند انتقالها من جيل لآخر. وينطبق قانون مندل إذا كانت الجينات قيد الدراسة واقعة على كروموسومات مختلفة كما حصل في دراسات مندل. لذا فإن مندل كان دائما يحصل على نسبة ثنائية الهجين ٩: ٣: ٣: ١. وقد سجلت الدراسات اللاحقة نسباً أخرى للتضريبات الثنائية الهجين dihybrid crosses التي تكون فيها الجينات واقعة على الكروموسوم نفسه. اعطِ أمثلة أخرى لنسب ثنائية

الهجين (أي ٩:٧) والحالات التي يتم الحصول فيها على هذه النسب (أي الارتباط linkage).

١ - في الدروسوفيلا *Drosophila*:

يقع الجين المسؤول عن لون الجسم الأسود ebony body color (e) على الكروموسوم الثالث، أما الجين المسؤول عن الجنحة الأثرية vestigial wings (vg) فيقع على الكروموسوم الثاني. ويجب عمل تضريبات (تلقيحات) متبادلة reciprocal crosses من هذه الأصول وكما يأتي:

(vg⁺ vg⁺ ; ee) ♀ سوداء الجسم X (vgvg; e⁺e⁺) ♂ أثري الجناح

و

(vg⁺ vg⁺ ; ee) ♂ أسود الجسم X (vgvg; e⁺e⁺) ♀ أثري الجناح

ملاحظة: يجب استعمال الإناث العذارى virgin females في هذه التضريبات. لماذا؟

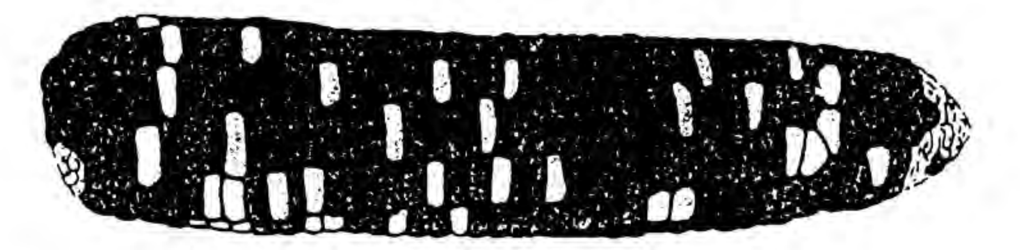
بعد مرور ما يقارب من ثمانية أيام تخلص من الآباء الأصلية. وبعد ظهور أفراد الجيل الأول سجل أعدادها وحدد الصفات التي ظهرت فيها. سجل النتائج في الجدول - ٣١ أو الجدول - ٣٢. ماذا تتوقع أن يكون النمط المظهري والوراثي للجيل الأول.

اعمل تزاوج لذكور وإناث الجيل الأول في قنينة جديدة. وبعد مرور ثمانية أيام تخلص من جميع أفراد الجيل الأول. وعند ظهور أفراد الجيل الثاني سجل أعدادها وحدد أعداد الصفات المدروسة ونسبها. سجل هذه المعلومات في الجدول- ٣١ او الجدول- ٣٢. املأ الجدول - ٣٣ بالمعلومات المناسبة وإعمل اختبار مربع- كاي لتحديد فيما إذا كانت النتائج التجريبية تتفق مع ما توقعت الحصول عليه نظرياً.

٢- في الذرة:

سيعطيك المدروس كل طالب بذور الجيل الثاني من الذرة المأخوذة من كوز

الذرة (عرنوص الذرة) ear of corn الموضح في الشكل- ٧٠. حدد الأنماط المظهرية الأربعة التي تم التعبير عنها. احسب عدد البذور أو الحبوب kernels الممثلة بكل نمط مظهري ثم سجلها. إستعمل الرموز المناسبة التي تمثل كل نمط مظهري تم التعبير عنه.



شكل- ٧٠: عرنوص (كوز) الذرة والذي يمثل dihybrid cross حيث أن النسبة هي ٩:٣:٣:١ تعكس وجود الجينات على مختلف الكروموسومات

الأليل	النمط المظهري
____________	____________
____________	____________
____________	____________
____________	____________

ما هي الصفات المتنحية recessive؟

ما هي الصفات السائدة dominant؟

ما هو النمط المظهري والوراثي لأفراد الجيل الأول؟

حدد النمط المظهري والوراثي للآباء الأصليين متماثلي الزيجات original P_1 homozygous parents.

اكمل الجدول – ٣٤ واعمل تحليل مربع- كاي لتحديد فيما إذا كانت النتائج التجريبية تتماشى مع ما تتوقع الحصول عليه في هذا التضريب أو التلقيح الثنائي الهجين dihybrid cross.

الجدول- ٣١: التضريبات ثنائية الهجين في الدروسوفيلا

____________   ____________ X ____________

اسم الطالب   الأنثى (P_1)   الذكر (P_1)

تاريخ تزواج الآباء ________ تاريخ فصل الآباء ________

النمط المظهري لإناث الجيل الأول ____ النمط المظهري لذكور الجيل الأول ____

____________ X ____________   ____________

أنثى الجيل الأول   ذكر الجيل الأول   تاريخ تزواج الجيل الأول

تاريخ فصل الجيل الأول ________ تاريخ فحص الجيل الأول ________

ذكور الجيل الثاني		إناث الجيل الثاني	
الأنماط المظهرية للجيل الثاني	العدد	الأنماط المظهرية للجيل الثاني	العدد
المجموع =		المجموع =	

	الذكر	الأنثى
النمط الوراثي للآباء	________	________
النمط الوراثي للجيل الأول	________	________
النمط الوراثي للجيل الثاني	________	________
	________	________
	________	________

الجدول- ٣٢: التضريبات ثنائية الهجين في الدروسوفيلا (التضريب المتبادل أو العكسي)

________   ________ X ________

اسم الطالب   الأنثى (P_1)   الذكر (P_1)

تاريخ تزواج الآباء ________ تاريخ فصل الآباء ________

النمط المظهري لإناث الجيل الأول ____ النمط المظهري لذكور الجيل الأول ____

________ X ________   ________

أنثى الجيل الأول   ذكر الجيل الأول   تاريخ تزواج الجيل الأول

تاريخ فصل الجيل الأول ________ تاريخ فحص الجيل الأول ________

ذكور الجيل الثاني		إناث الجيل الثاني	
الأنماط المظهرية للجيل الثاني	العدد	الأنماط المظهرية للجيل الثاني	العدد
المجموع =		المجموع =	

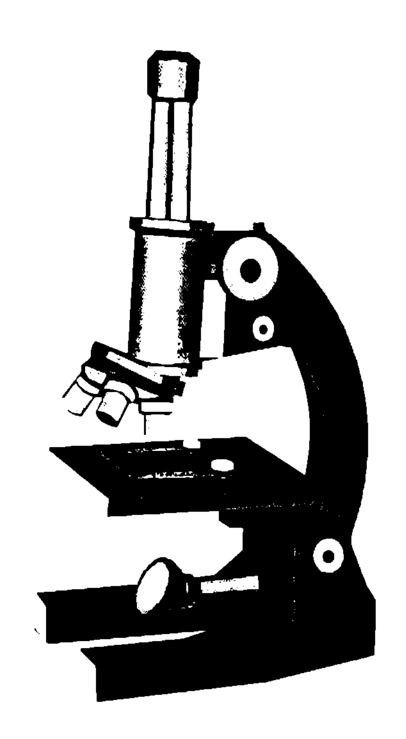
	الذكر	الأنثى
النمط الوراثي للآباء	________	________
النمط الوراثي للجيل الأول	________	________
النمط الوراثي للجيل الثاني	________	________
	________	________
	________	________

الجدول- ٣٣: نتائج تحليل مربع- كاي للتضريب ثنائي الهجين في الدروسوفيلا

النمط المظهري	النمط الوراثي	الملاحظ	المتوقع	الملاحظ- المتوقع	(الملاحظ– المتوقع)^2	(الملاحظ – المتوقع)^2 / المتوقع
المجموع						
الاستنتاج:						

الجدول- ٣٤: نتائج تحليل مربع- كاي للتضريب ثنائي الهجين في الذرة

النمط المظهري	النمط الوراثي	الملاحظ	المتوقع	الملاحظ- المتوقع	(الملاحظ– المتوقع)^2	(الملاحظ – المتوقع)^2 / المتوقع
المجموع						
الاستنتاج:						



المختبر الحادي عشر

الأساس الكروموسومي للوراثة

Chromosomal Basis of Heredity

أن من إحدى الخصائص البارزة للكائنات الحية هي قابليتها على نقل الصفات الوراثية hereditary charecteristics من جيل لآخر. ولم يتم التعرف على الأساس الفيزياوي لعملية النقل هذه لغاية أوائل القرن العشرين عند وضع الأساس الكروموسومي للوراثة. ففي عام ١٩٠٣ أشار والتر ساتون Walter S.Sutton في أثناء دراسته لتحديد الجنس في الحشرات إلى أن الكروموسومات هي التي تحمل العوامل الوراثية وتنقلها من الآباء إلى الذرية offspring. وقد أكد على الحقيقة القائلة بأن كل خلية في الحالة الثنائية diploid condition تحتوي على مجموعتين من الكروموسومات المتماثلة مظهرياً، وفي أثناء عملية الانقسام الاختزالي وعند تكوين الأمشاج gametes يستلم كل مشيج نصف عدد الكروموسومات (العدد الأحادي haploid) المتماثلة. وفضلاً عن ذلك فقد أوضح أيضاً بأن عدد العوامل الوراثية يتجاوز بكثير عدد الكروموسومات وعليه لابد من وجود عوامل وراثية مختلفة (الجينات genes) مرتبطة بكل كروموسوم. ومع أن ساتون لم يثبت الأساس الكروموسومي للوراثة إلا أن أحد أساتذته أدموند ولسون Edmund B. Wilson قد أوضح في عام ١٩٠٥ دور الكروموسومات في الوراثة من خلال دراسته على طبيعة تحديد الجنس sex determination في الحشرات. حيث لاحظ بأن خلايا إناث الحشرات تحتوي على زوج من الكروموسوماتX، بينما تحتوي خلايا الذكور على كروموسوم X واحد فقط. علاوة على ذلك ففي بعض الأنواع (بضمنها الإنسان) تحتوي الأمشاج الذكرية على كروموسوم غير موجود في الإناث يدعى الكروموسومY. وبينما تحتوي كل بيضة على كروموسوم X واحد فإن نصف عدد النطف الذكرية يحتوي على الكروموسوم X ويحتوي النصف الآخر على الكروموسومY. لذا يؤدي إخصاب البيضة بنطفة تحمل الكروموسوم X إلى تكوين بيضة مخصبة تحتوي على كروموسوميX.

وتتطور هذه البيضة المخصبة إلى أنثى، بينما يؤدي إخصاب البيضة بنطفة تحمل كروموسوم Y إلى تكوين ذكر. وقد أوضحت الدراسات اللاحقة الأساس الكروموسومي نفسه لتحديد الجنس في معظم الكائنات الحية المتكاثرة جنسياً.

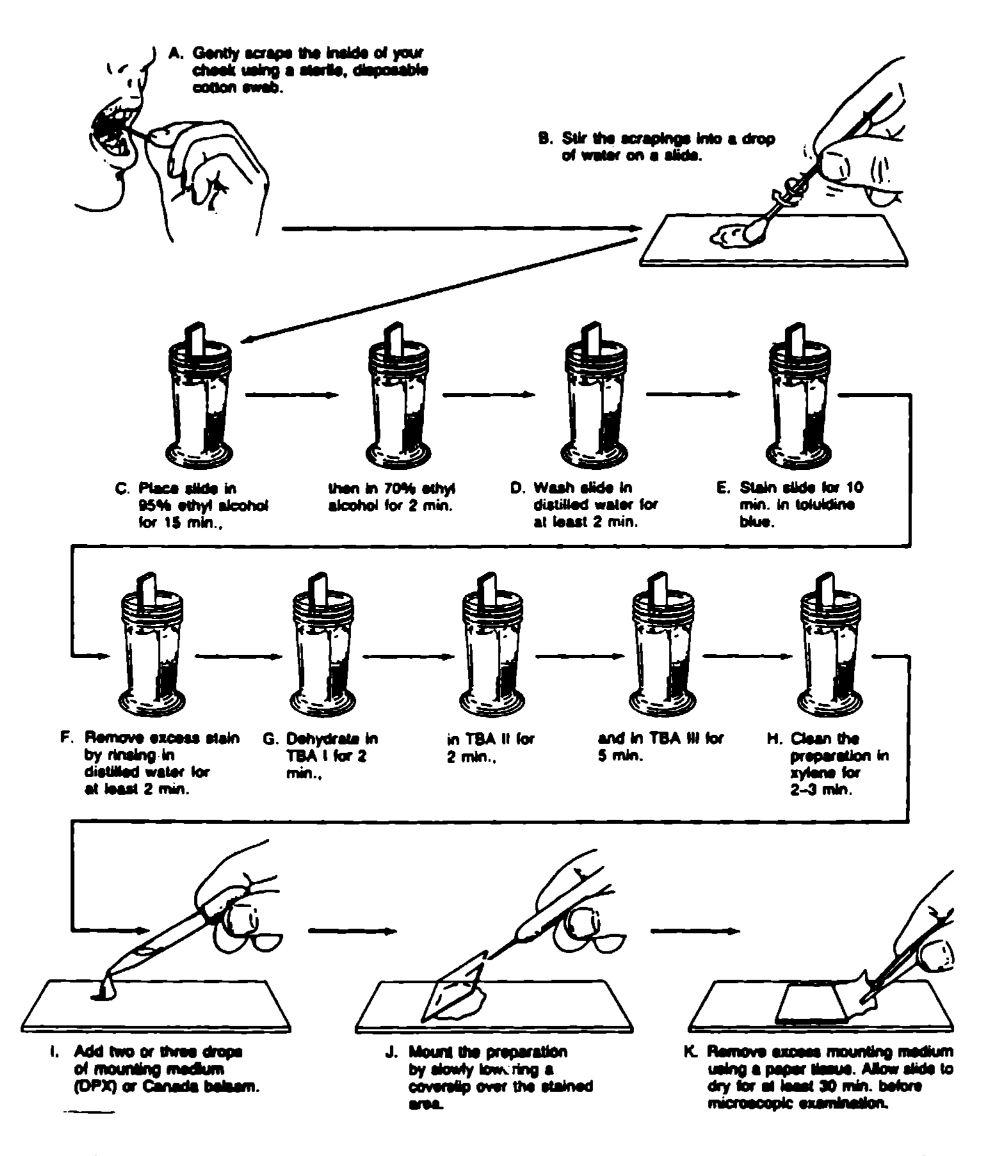
أ- كروماتين الجنس في الإنسان Human Sex Chromatin:

لاحظ موري بار murray L.Barr في عام ١٩٥٩ أن هناك إختلافاً مظهريا بين نوى خلايا الذكر والأنثى التي لا تمر بعملية الانقسام الاعتيادي. إذ لاحظ وجود جسم صغير قرب النوية في خلايا إناث القطط بالمقارنة مع خلايا ذكور القطط. وقد لوحظ هذا التمايز الجنسي sexual differntiation في العديد من الثديات الأخرى وبضمنها الإنسان.

وقد أوضحت التقنيات الصبغية الخصائص الكيمياوية لهذا الجسم الصغير والتي تماثل الخصائص الكيمياوية للكروموسومات، ويدعى هذا التركيب في الوقت الحاضر بكروماتين الجنس sex chromatin أو جسم بار barr body. يمثل جسم بار أحد كروموسومي X في خلايا الأنثى. فعندما تكون الخلية في الطور البيني interphase من الإنقسام الأعتيادي فإن مادة أحدى كروموسومي X تكون بشكل غير ملتف uncoiled form في نواة الخلية وبذلك تكون غير مرئية. أما كروموسوم X الآخر فإن يبقى بشكل ملتف ويصطبغ بشدة وبذلك يمكن تمييزه بشكل جسم بار. وفي الإنسان ترتبط اجسام بار بالجزء الداخلي من الغشاء النووي لخلايا الإناث.

أما نوى خلايا الذكور فتكون خالية من أجسام بار. لذا فإن أجسام بار تمثل وسيلة للتمييز بين خلايا الذكر وخلايا الأنثى عندما تكون الكروموسومات غير مرئية. ونظراً لإكتشاف جسم بار فقد بات الآن ممكناً تشخيص جنس الطفل غير المولود في مراحله المبكرة من خلال إستعمال تقنية amniocentesis ففي هذه العملية يتم سحب كمية قليلة من السائل الأمنيوتي amniotic fluid والخلايا الجنينية الطافية فيه في الأشهر المبكرة من الحمل. بعدها يتم فحص الخلايا الموجودة في السائل لملاحظة وجود أجسام بار لتحديد جنس الطفل.

وفي هذا الجزء من المختبر سيقوم كل طالب بتهيئة مسحة فمية buccal smear للخلايا من الجزء الداخلي لفمك. وبإستعمال الطريقة الموضحة في الشكل-٧١. حدد وجود (أو غياب) جسم بار في هذه الخلايا.



شكل- ٧١: طريقة إثبات وجود Barr bodies في الخلايا الطلائية لبطانة فم الإنسان

حدد موقع الخلايا تحت عدسة القوة الصغرى للمجهر المركب. ضع قطرة من الزيت على غطاء الشريحة مباشرة تحت العدسة الشيئية للقوة الصغرى ثم حول العدسة إلى العدسة الشيئية الزيتية وافحص المستحضر. ويجب أن تصطبغ النواة باللون الأزرق الشاحب pale blue . أما جسم بار فسوف يظهر بشكل جسم أزرق مسود blue- black قرب الغشاء النووي. إفحص ٥٠ خلية ثم إحسب عدد الخلايا

المحتوية على جسم بار. لاتحسب الخلايا التي تظهر بشكل غير طبيعي abnormal (كالخلايا المنكمشة والمطوية والمتكسرة والضعيفة)، أو تلك المصطفة فوق بعضها. لا يقلق الطالب إذا كان ذكراً ووجد أجسام بار في خلاياه، إذ أن ما يقارب ٢٪ من جميع خلايا الذكر تحتوي بشكل طبيعي على كروماتين الجنس. سجل نتائجك ونتائج بقية الطلبة في الصف في الجدول – ٣٥.

الجدول – ٣٥: النسبة المئوية لأجسام بار في خلايا الخد

الجنس	الخلايا الخاصة بك	معدل الصف	مدى الصف
ذكر			
أنثى			

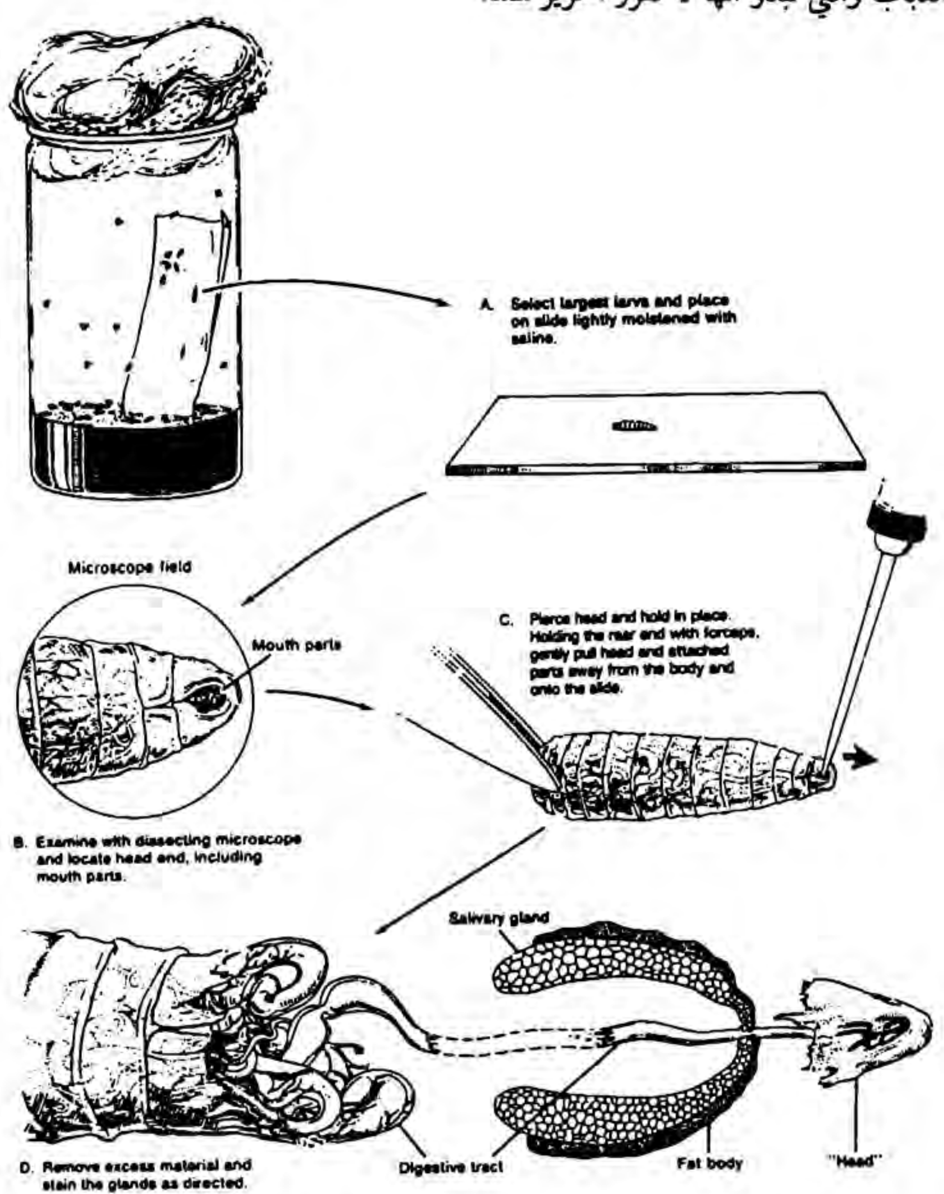
ب- الشكل المظهري للكروموسوم Chromosome Morphology:

١- كروموسومات الغدة اللعابية في الدروسوفيلا

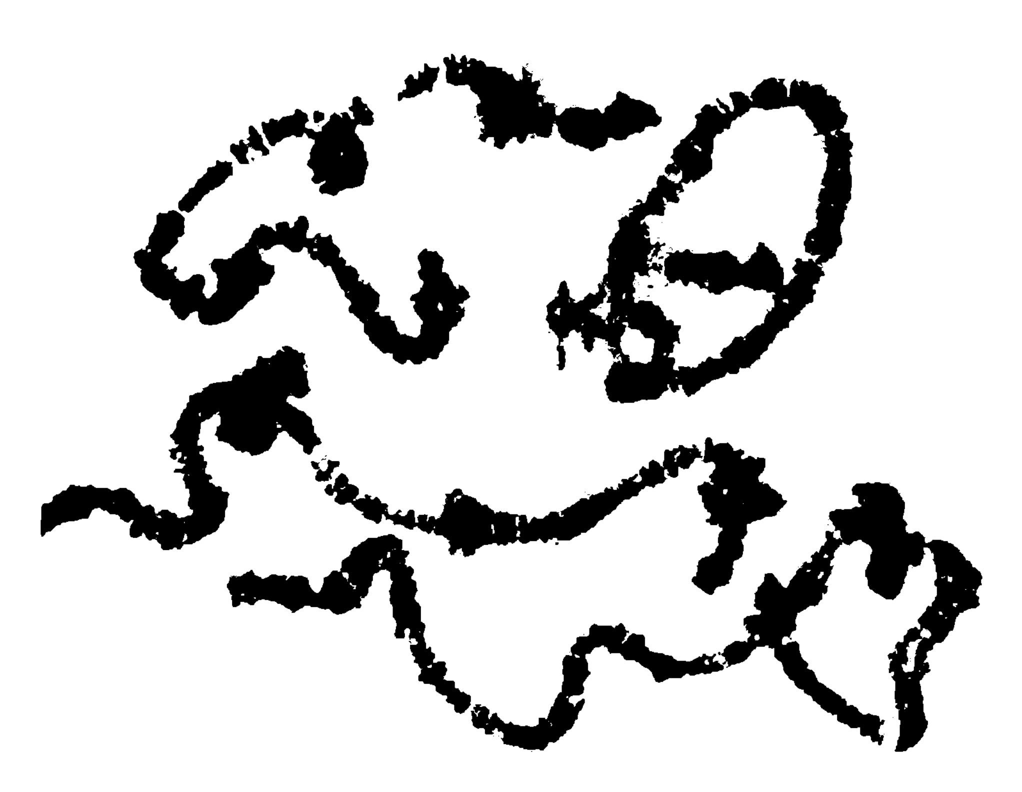
يمكن دراسة الشكل المظهري للكروموسومات من خلال الكروموسومات الكبيرة لخلايا الغدة اللعابية في الدروسوفيلا وبقية الذباب. وبالرغم من التخصص العالي لخلايا الغدة اللعابية هذه إلا أنها تشابه معظم الخلايا الأخرى من حيث المكونات النيوكليوتيدية nucleotide components الرئيسة الموجودة فيها. وان خلايا الغدة هذه لا تشابه العديد من الخلايا الأخرى من حيث أنها أول أصل للغدة first gland primordium يتكون في الجنين.

وأن الخلايا المكونة للغدة لا تنقسم. لذا فإن الغدة اللعابية لليرقة larval salivary gland تحتوي على عدد ثابت من الخلايا قبل فقس البيضة ولغاية انحلال الغدة في أثناء تكوين طور العذراء puparium. وتنمو الغدة من خلال تضخم خلاياها، إذ حالما تتضخم الخلية تتضخم النواة وكروموسوماتها أيضاً. وتصل الكروموسومات إلى أقصى حجم لها قبل تكوين العذراء pupation. وأن الوظيفة المهمة لهذه الغدد اللعابية هي

إفراز مادة تستعمل في نسيج الشرنقة cocoon أو لاتصال العذراء على الوسط الموجودة عليه. كما وتفرز الغدد اللعابية أيضاً الأنزيمات الهضمية digestive enzymes في أثناء تناول الغذاء لغرض نمو اليرقة، وتكون هذه الغدد نامية بشكل جيد في بعض يرقات الذباب والتي تبدو أنها لا تفرز الحرير silk.



شكل- ٧٢: طريقة إزالة الغدة اللعابية ليرقات ذبابة الفاكهة (الدروسوفيلا)



شكل- ٧٣: الكروموسومات الموجودة في الغدة اللعابية في *Sciara coprophila* حيث يمكن ملاحظة differentiation الطولي

لا يقتصر وجود هذه الكروموسومات الكبيرة متعددة الخيوط polytene على خلايا الغدة اللعابية فقط بل إنها توجد أيضاً في خلايا بطانة الأمعاء gut epithelium وفي أنيبيبات مالبيجي Malpighian tubles لليرقة وفي الوسادات القدمية foot pads للذباب البالغ.

وسيتم في هذا الجزء من المختبر دراسة الشكل المظهري لكروموسومات الغدة اللعابية ليرقة ذبابة الفاكهة *Drosophila melonogaster*.

١- افحص مزرعة الدروسوفيلا culture وحدد مواقع اليرقات، واختر أكبرها حجماً وأبطأها حركة. وتفضل اليرقة الزاحفة إلى أعلة قنينة المزرعة. وباستعمال الملقط forceps ضع اليرقة على شريحة زجاجية مرطبة بمحلول ملحي saline solution. ثم افحصها باستعمال المجهر الستيريوسكوبي stereoscopic microscope ولاحظ

النهاية الرأسية المدببة المحتوية على أجزاء الفم السوداء black mouth parts وللحصول على الغدد اللعابية لابد من فصل النهاية الرأسية عن بقية الجسم. (الشكل- ٧٢).

٢- باستعمال إبرة دقيقة اثقب الرأس عند نهايته الأمامية قدر الإمكان وستلاحظ بأن اليرقة تلتوي لذا يجب عليك تكرار المحاولة عدة مرات قبل أن تنجح بإنجاز العملية.

٣- بعد تثبيت الرأس امسك النهاية الخلفية بملقط حاد النهايتين ثم بحركة سريعة عند النهاية الأمامية شد اليرقة لحين تمزق أجزاء الفم وانسحابها على الشريحة الزجاجية الرطبة. وتتم هذه العملية تحت المجهر الستيريوسكوبي (التشريحي).

٤- عند انسحاب الغدد اللعابية ستنسحب معها أجزاء من القناة الهضمية والأجسام الدهنية fat bodies. أضف قطرة من المحلول الملحي saline إلى الشريحة. وتخلص من القناة الهضمية وبقية الأجزاء الأخرى باستعمال شفرة حلاقة razor blade أو مشرط scalpel والإبقاء على الغدد اللعابية على الشريحة.

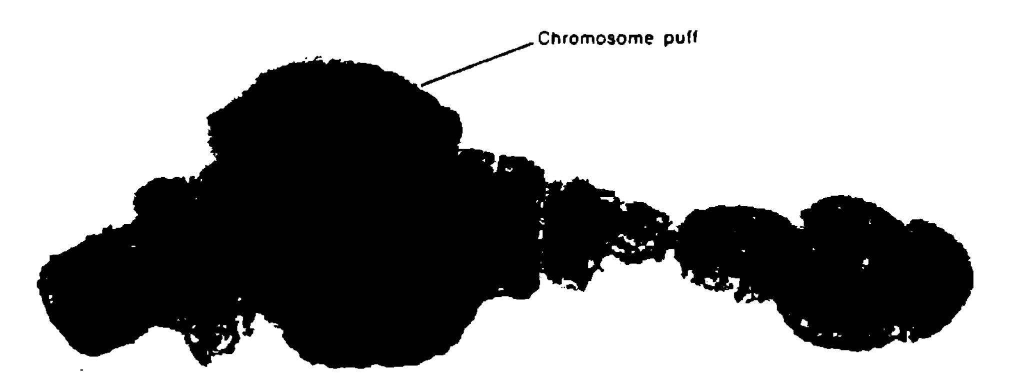
٥- أصبحت الآن الغدد اللعابية مهيأة لعملية التصبيغ. تخلص من المحلول الملحي الزائد باستعمال ورق ترشيح. ولا تحاول تماس ورقة الترشيح مع الغدد اللعابية خوفاً من التصاقها بالورقة. أضف إلى الغدد اللعابية قطرة من صبغة الأسيتو- أورسين aceto- orcein stain.

٦- بعد ٥ دقائق من إضافة الصبغة، ضع غطاء الشريحة على الغدد. ثم ضع قطعة صغيرة من الورق النشاف على غطاء الشريحة مع الضغط بإصبع الإبهام لسحق أو هرس squash الغدد. افحص المستحضر تحت المجهر المركب. فإذا تمت عملية الهرس بشكل جيد فإن خلايا الغدة ستنفصل عن بعضها بحيث يمكنك ملاحظة النوى في معظم الخلايا.

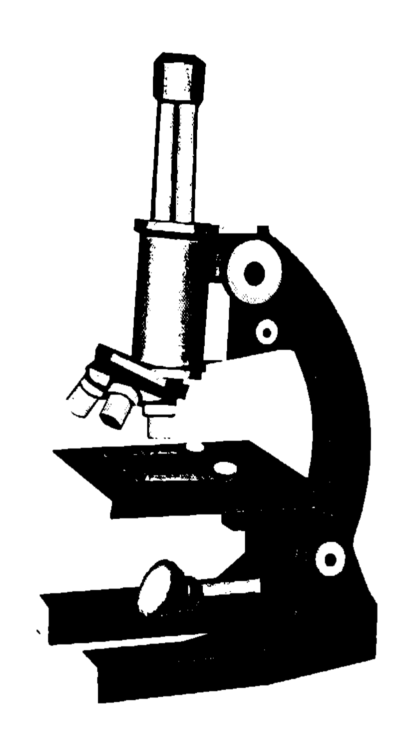
٧- عند اصطباغ المستحضر بشكل جيد يمكنك ملاحظة الحزم الشريطية banding على طول الكروموسومات.

٢- نفخة الكروموسوم Chromosome Puffs

إن دراسة الكروموسومات في الذبابة *Chironomus* يوضح بأن الكروموسومات منتفخة وهي تظهر أثناء النمو حيث يعتقد أنها تتولد من فعالية الجينات أثنا النمو. وقد لاحظ الباحثون بأن الهرمونات ذات العلاقة بانسلاخ الحشرات تسبب انتفاخ الكروموسومات puffing (على الأستاذ توفير سلايد يوضح الكروموسوم المنتفخ لدراسته من قبل الطلاب في المختبر (شكل- ٧٤).



شكل- ٧٤: الكروموسومات العملاقة في الغدد اللعابية لذبابة *Chironomus*



المختبر الثاني عشر

وراثة الإنسان

Human Genetics

تتحدد الصفات الخاصة بالفرد سواء كان نباتاً أو حيواناً بعد الإخصاب fertilization عند اتحاد الكروموسومات الذكرية والأنثوية التي تحملها الأمشاج gametes . وتحمل هذه الكروموسومات الجينات التي تحدد الصفات المختلفة التي يتم التعبير عنها بواسطة الكائن الحي. وفي هذا الجزء من المختبر سيقوم كل طالب بدراسة توارث inheritance عدد من الصفات المظهرية (مثل طي اللسان tongue rolling ولفة أو ثنية الشعر hair whorl ولون الشعر hair color) والصفات الفسلجية (مثل استجابات تذوق PTC وبنزوات الصوديوم) وكذلك مجاميع الدم في الإنسان.

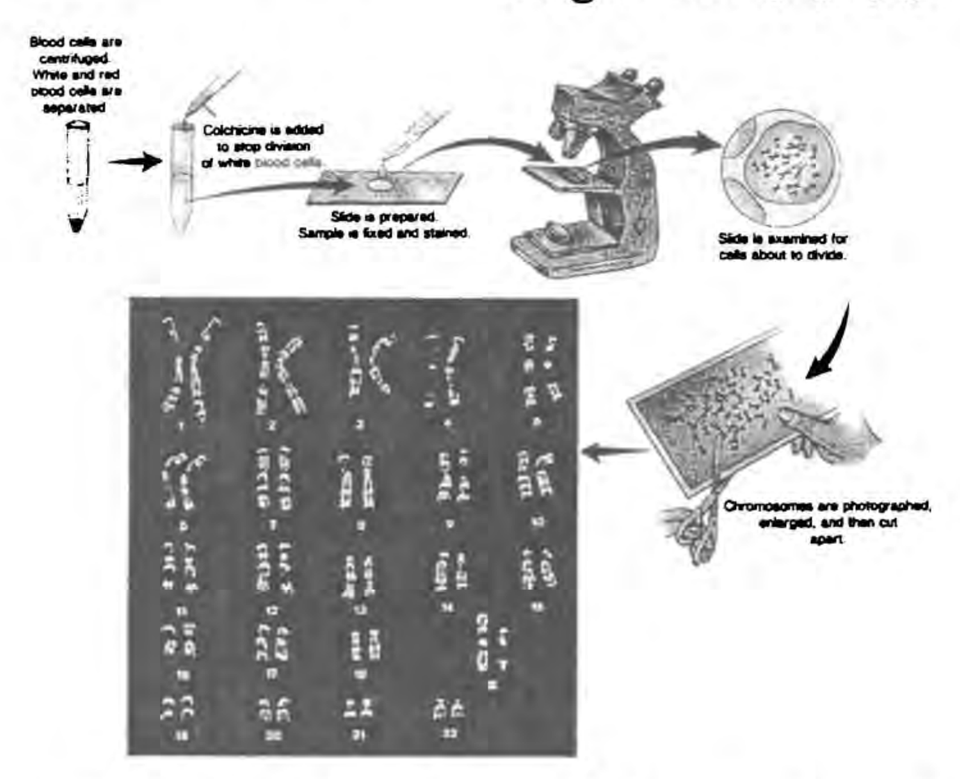
أ- توارث الصفات المظهرية

Inheritance of Morphological Characteristics

١- طي اللسان Tongue Rolling:

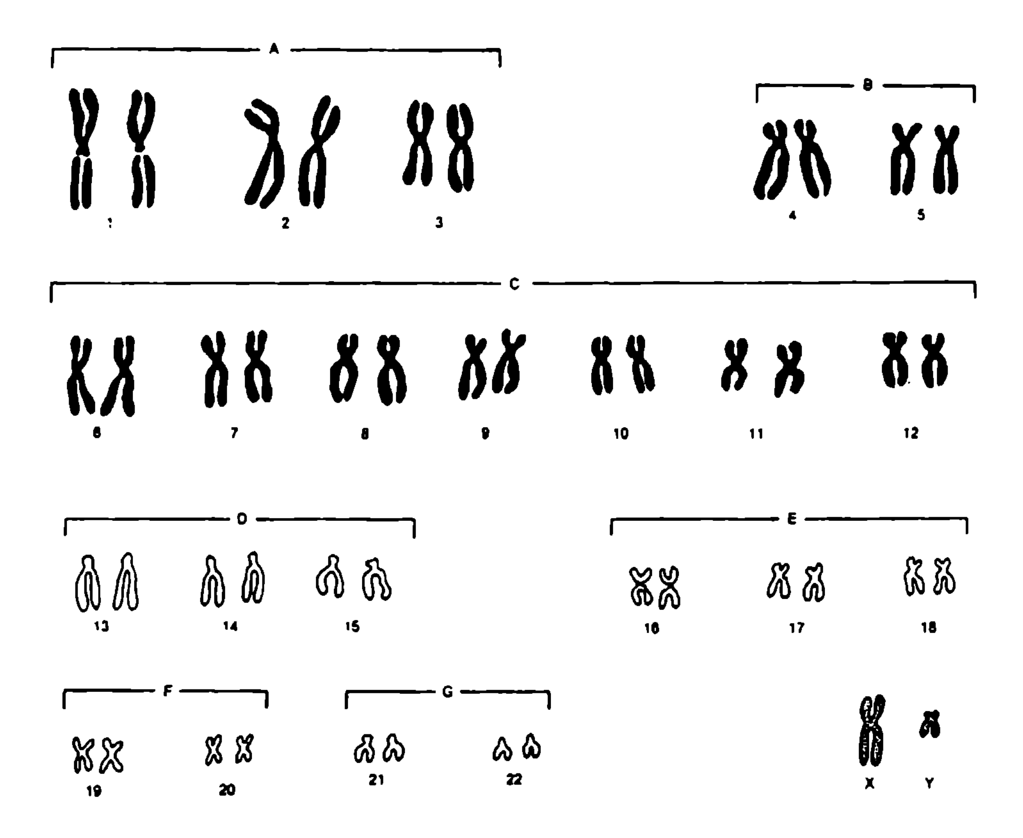
يمكن للعديد من الأشخاص طي الحافات الجانبية للسان بحيث تتقارب حافات اللسان من بعضهما في طرف اللسان (الشكل-٨٠). سجل الملاحظات حول قدرة بعض الطلبة على طي اللسان كما في الجدول-٣٦. ثم ثبت المعلومات حول الشعب الأخرى في الصف وحدّد النسب المئوية للطلبة الذين يمكنهم طي اللسان rollers والذين لا يمكنهم طي اللسان nonrollers. وإن هذه النسب المئوية لا تشير إلى فيما إذا كانت القابلية على طي اللسان متوارثة أم لا، وإذا كانت متوارثة فهل إن الجين المسؤول عنها هو جين سائد dominant أو متنحي recessive. ولغرض معرفة ذلك حدّد عدد أفراد عائلتك الذين لديهم هذه الصفة وسجل ملاحظاتك في الشكل ٧٨ من خلال وضع علامة (+) في الدائرة أو المربع للإشارة إلى الذين يمكنهم طي اللسان وعلامة (-) للإشارة إلى الذين لا يمكنهم طي اللسان. ولغرض مساعدتك في تحديد فيما إذا كانت هذه الصفة متوارثة استعمل الحرف T للإشارة إلى الصفة السائدة (صفة طي اللسان rolling)، والحرف t للإشارة إلى الصفة المتنحية (صفة عدم طي اللسان nonrolling). ولا بد من الإشارة إلى أن هذه الصفة المتوارثة إذا كانت متنحية فإن الأليلين alleles يكونان متنحيين (أي يشار إليهما tt). أما إذا كانت الصفة المتوارثة سائدة فإن الأليلين قد يوجدان بحالة متماثلة الزيجات homozygous

(TT) أو مختلفة الزيجات heterozygous (Tt). ومن خلال التعرف على الأقارب siblings والأباء parents والأجداد يمكن تحديد فيما إذا كانت الصفة متماثلة الزيجات أو مختلفة الزيجات. هل من الممكن تحديد النمط الوراثي الخاص (TT أو Tt أو tt) لكل فرد من أفراد العائلة ؟ وضح ذلك.



شكل - ٧٥: تحضيرات وتقنيات مختبرية من أجل دراسة شكل وطبيعة كروموسومات الإنسان human karyotype. وإن استعمال صبغة خاصة توضح ظهور أحزمة على الكروموسومات. إن هذه الأحزمة bands تساعد الباحثين على تشخيص وتحليل الكروموسومات

لمساعدتك في تحديد طريقة التوارث لا بد من الضروري التعرف على توارث لون الشعر في الإنسان. إذ من الممكن على سبيل المثال لأبوين لا يمتلكان شعراً أحمراً من إنجاب طفلاً بشعر أحمر، إلا إنه من ناحية أخرى لا يمكن لأبوين ذوا شعر أحمر من إنجاب طفل لا يمتلك شعراً أحمراً.

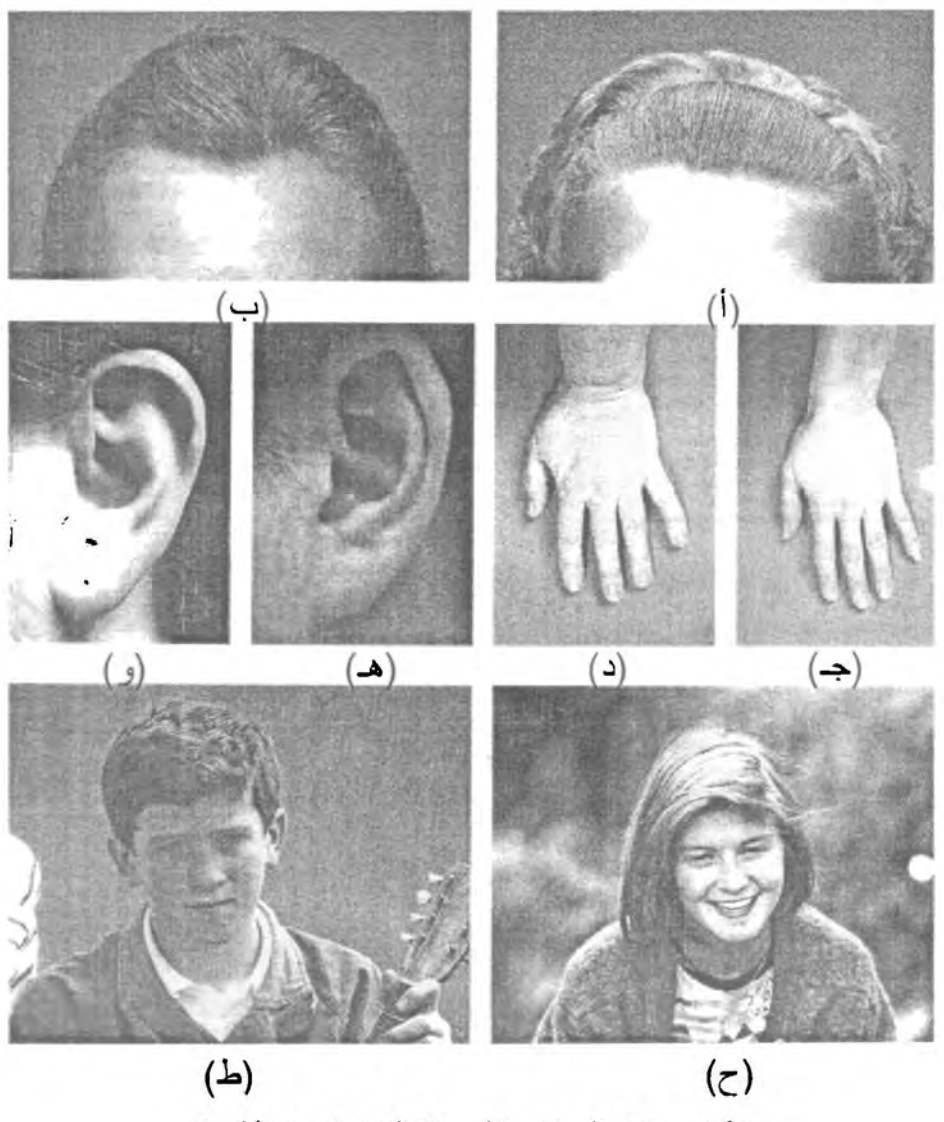


شكل- ٧٦: مجموعة كروموسومات الإنسان (الرجل) الطبيعي karyotype.

على ضوء المعلومات التي حصلت عليها حول انتقال لون الشعر هل أن صفة طي اللسان تتوارث بشكل جين سائد أو متنحي ؟.

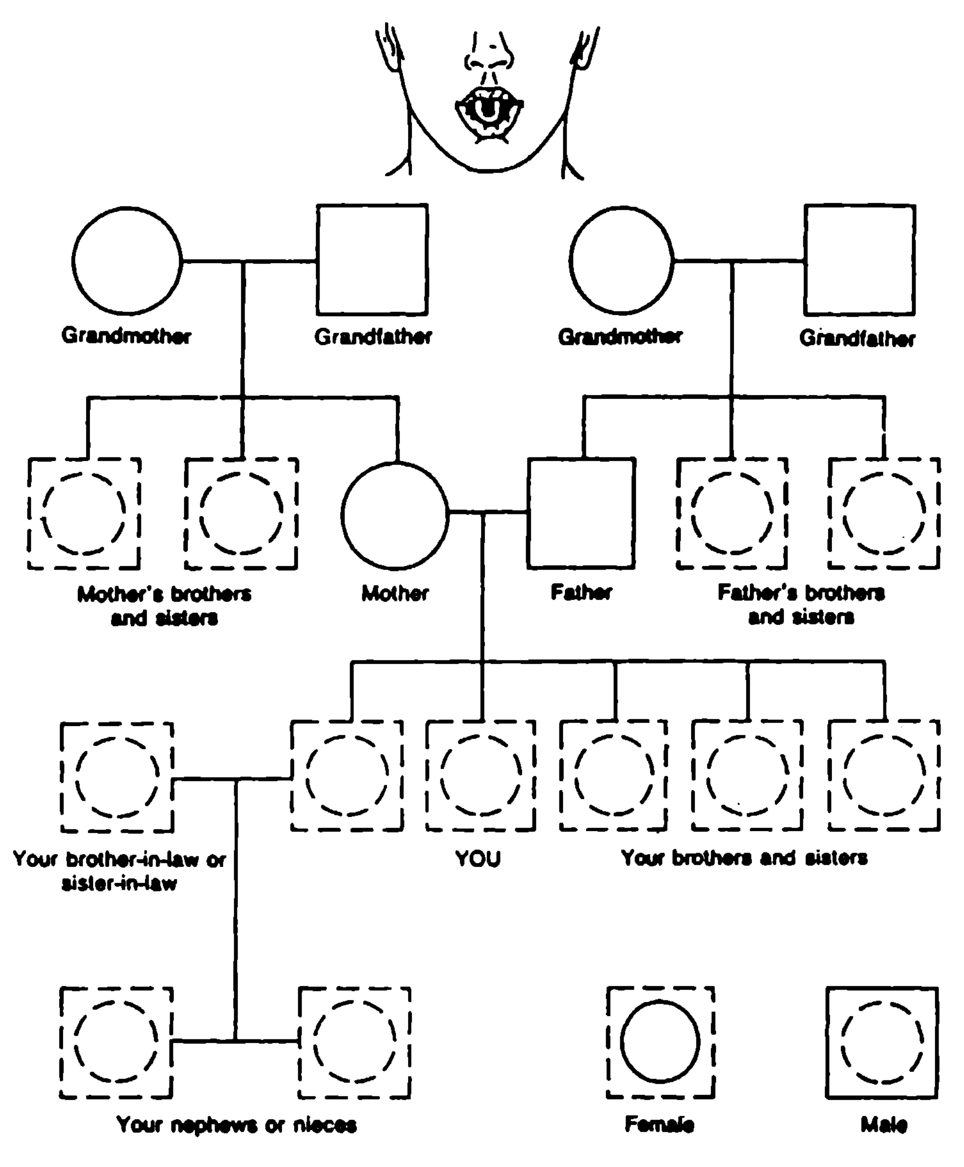
٢- لفة أو ثنية الشعر Hair Whorl

توجد لفة الشعر في الجزء البعيد من قمة الرأس، وقد تكون باتجاه عقرب الساعة أو بعكسه. حدد اتجاه لفة الشعر لزملائك في الصف وسجل المعلومات في الجدول-٣٧. سجل المعلومات الخاصة ببقية الشعب. وحدد اتجاه لفة الشعر السائد من خلال المعلومات المسجلة.



شكل- ٧٧: الصفات الموروثة الشائعة عند الإنسان

أ- نمو الشعر بخط مستقيم continuous hairline. ب- نمو الشعر بشكل V والذي هو سائد على الحالة الأولى وتدعى حالة نمو الشعر بشكل V حالة Widow peak. (جـ) حالة الأصابع الطويلة هي متنحية تجاه حالة الأصابع القصيرة كما هو في الشكل (د). (هـ) فص الأذن الملتحم مع الخد هي حالة متنحية من حالة فص الأذن غير الملتحم مع الخد في الشكل (و). وإن (ح) الوجه الخالي من النمش هي حالة متنحية تجاه حالة الوجه الحاوي على النمش freckles كما في (ط).



شكل - ٧٨: وراثة طي اللسان tongue rolling

الجدول – ٣٦: تحليل القابلية على طي اللسان

رقم الشعبة في الصف	عدد الطلبة في الصف	عدد الذين يمكنهم طي اللسان	عدد الذين لا يمكنهم طي اللسان	النسبة المئوية للذين يمكنهم طي اللسان	النسبة المئوية للذين لا يمكنهم طي اللسان
١					
٢					
٣					
٤					
٥					
٦					
٧					
٨					
٩					
١٠					
١١					
١٢					
١٣					
١٤					
١٥					

٣- نقطة أذن دارون Darwin's Ear Point:

إن وجود نقطة واضحة على الحافة الخارجية للأذن يتم توارثها بشكل صفة سائدة (الشكل-٧٩). ويكون هذا الجين السائد نادراً في المجتمع البشري ويُظهر تغايراً في طريقة التعبير عنه. فعلى سبيل المثال يمتلك بعض الأفراد نقطة دارون في أذن واحدة فقط. فضلاً عن ذلك فإن هناك بعض الأشخاص الذين يُظهرون الجين

المتنحي ينقلون الجين السائد. اطلب من زميلك التعرف على هذه الصفة في أذنيك. ما هي النسبة المئوية للطلبة الذين لديهم هذه الصفة؟.

الجدول – ٣٧: تحليل لفة أو ثنية الشعر في الإنسان

رقم الشعبة في الصف	عدد الطلبة في الصف	العدد في حالة كون لفة الشعر باتجاه عقرب الساعة	العدد في حالة كون لفة الشعر عكس عقرب الساعة	النسبة المئوية للفة الشعر باتجاه عقرب الساعة	النسبة المئوية للفة الشعر باتجاه عقرب الساعة
١					
٢					
٣					
٤					
٥					
٦					
٧					
٨					
٩					
١٠					
١١					
١٢					
١٣					
١٤					
١٥					

٤- حافة ويدو البارزة Widow's Peak

تمثل حافة ويدو البارزة حدود الشعر الأمامية الممتدة في وسط الجبهة في الأفراد (الشكل – ٧٩). لاحظ حدود شعرك وحدود شعر زملائك. هل تبدو هذه الصفة سائدة أم متنحية.

٥- انطواء اللسان للخلف Tongue Folding

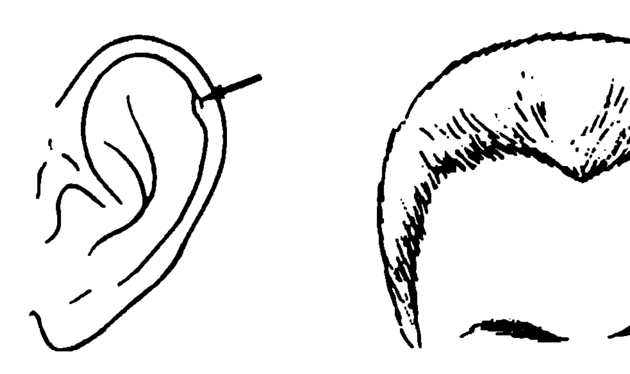
إن القابلية على طوي اللسان نحو الخلف دون ضغطه على الأسنان العليا (الشكل – ٧٩) تعد من الحالات النادرة جداً، وتحدث في المجتمع البشري بتكرار يتراوح أقل من مرة واحدة لكل ألف فرد. ويتم توارث هذه الصفة بشكل صفة سائدة. ما هي النسبة المئوية للطلبة في الصف الذين لديهم هذه الصفة.

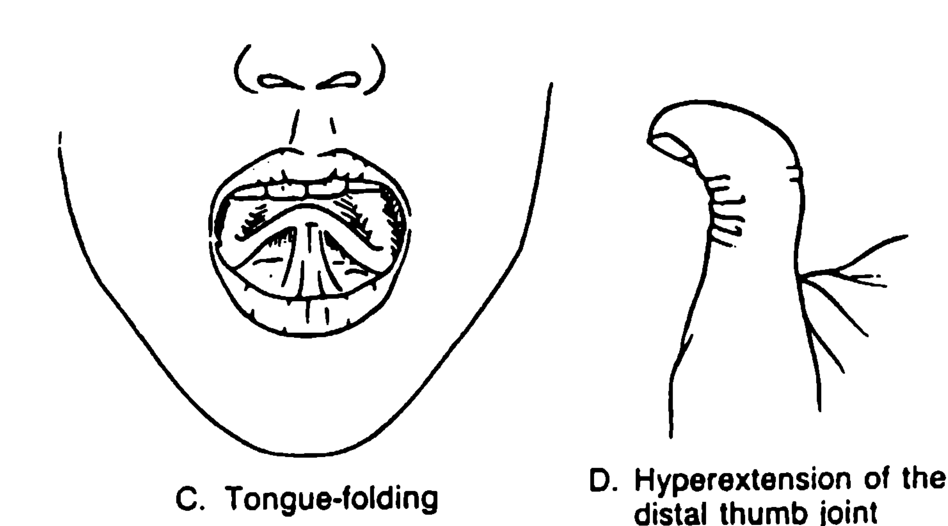
٦- فرط انبساط المفصل البعيد للإبهام
Hyperextension of the Distal Thumb Joint

عندما تكون هذه الصفة المتنحية متماثلة الزيجات في الأفراد فإن هؤلاء الأفراد يمكنهم ثني القطعة البعيدة من الإبهام إلى الخلف بحيث تتكون زاوية مقدارها ٦٠ درجة بين محوري قطعتي الإبهام القريبة proximal segment والبعيدة distal segment (الشكل-٧٩). لاحظ هذه الصفة في إبهامك وإبهام بقية الطلبة في الصف وحدد النسبة المئوية لهذه الصفة.

ب- توارث صفة فسلجية
Inheritance of a Physiological Characteristic

تحذير: إذا كان لديك حساسية غذائية معينة يفضل عدم الاشتراك في اختباري التذوق الآتيين.





شكل – ٧٩: وراثة صفات موروفولوجية في الإنسان

١- القابلية على تذوق الفنيل ثايوكارباميد:

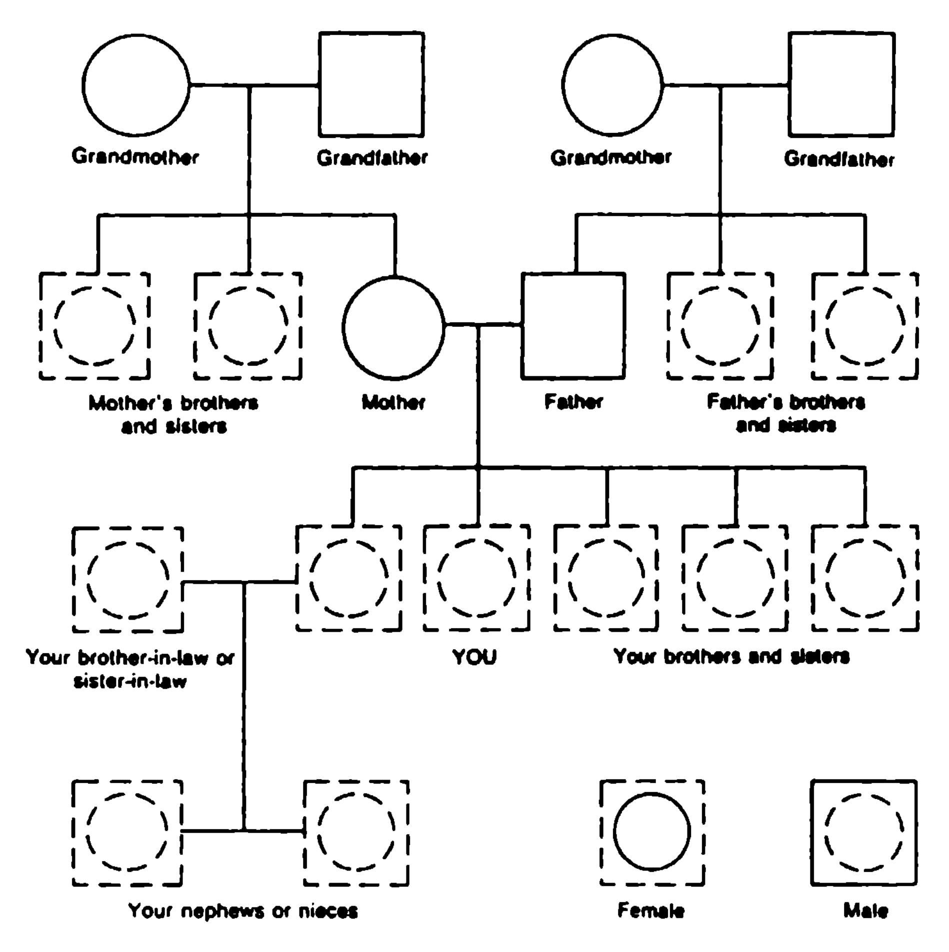
سيزودك المدرس بقطعة من الورق المعاملة بالمادة الكيمياوية الفنيل ثايوكارباميد phenylthiocarbamide المعروفة بـ PTC. ويشعر بعض الأشخاص عند مضغ قطعة الورق هذه بطعم مر bitter taste، بينما تكون هذه القطعة الورقية عديمة الطعم لأشخاص آخرين. كما وأن هناك تغاير في تذوق مادة PTC بين المر والحلو في حالة الأشخاص الذين يتذوقون هذه المادة. هل أنت من الأشخاص الذواقين taster أو

غير الذواقين nontaster لهذه المادة. سجل نتائج تذوق الطلبة لهذه المادة في صفك وبقية الصفوف في الجدول-٣٨.

Trait	Dominant Phenotype	Recessive Phenotype
Ear lobes	Free	Attached
Pigment distibution	Freckles	No Freckles
Hairline	Widow's peak	Straight
Little finger	Bent	Straight
Tongue roller	Yes	No

شكل – ٨٠: بعض الصفات الوراثية السائدة (dominant phenotype) والمتنحية recessive phenotype عند الإنسان

لتحديد طبيعة توارث تذوق مادة PTC فإن المدرس سيعطيك عدة أشرطة من ورق PTC لأخذها إلى البيت للحصول على معلومات حول العائلة لكي تستطيع إكمال الشكل-٨١. استعمل الإشارة (+) للدلالة على الذواقين والإشارة (-) للدلالة على غير الذواقين. ومن خلال استعمال الحرف T للصفة السائدة والحرف t للصفة المتنحية حدد الأنماط الوراثية genotypes (TT أو Tt أو tt) لكل فرد تم اختياره في الشكل-٨١. وعلى أساس المعلومات التي حصلت عليها حدد فيما إذا كانت القابلية على تذوق مادة PTC تُنقل بشكل جين سائد أو متنحي.



شكل – ٨١: وراثة القابلية عند الإنسان لتذوق مادة PTC

الجدول – ٣٨: تحليل الحساسية لتذوق مادة PTC

رقم الشعبة في الصف	عدد الطلبة	عدد الذواقين	عدد غير الذواقين	النسبة المئوية للذواقين	النسبة المئوية لغير الذواقين
١					
٢					
٣					
٤					
٥					
٦					
٧					
٨					
٩					
١٠					
١١					
١٢					
١٣					
١٤					
١٥					

٢- القابلية على تذوق بنزوات الصوديوم

تعد بنزوات الصوديوم sodium benzoate من المواد الأخرى التي يشعر بطعمها بعض الأفراد ولا يشعر بطعمها آخرون. وتستعمل هذه المادة في بعض الحالات بتركيز ١ , ٠٪ كمادة حافظة للأغذية. ونظراً لوجود خلاف حول التأثيرات الضارة لهذه المادة على الصحة فإن هناك تبايناً واسعاً حول القوانين الخاصة باستعمال أملاح البنزوات benzoate. إذ أن هناك بعض.الولايات في أمريكا تمنع استعمال هذه المادة؛

بينما تضع الولايات الأخرى قيوداً صارمة حول استخدامها. وهناك ولايات أخرى لها قوانين تسمح باستعمال البنزوات كمواد حافظة للأغذية.

سيزودك المدرس بقطعة ورقية معاملة ببنزوات الصوديوم لغرض مضغها وتحديد طعم هذه المادة (مالحاً أو حلواً أو حامضياً أو مراً أو عديم الطعم).

ما هي النسبة المئوية لطلبة صفك الذواقين وغير الذواقين ؟ ومن بين الذواقين لمادة بنزوات الصوديوم حدد الطَعَم الأكثر والأقل شيوعاً.

جـ- توارث مجاميع الدم في الإنسان

Inheritance of Human Blood Groups

لاحظ الدكتور كارل لاندشتاينر Karl Landsteiner لأول مرة في عام ١٩٠٠ وجود مجاميع دم مختلفة في المجتمع البشري. وقد أدت أبحاثه إلى تحديد أربع مجاميع رئيسية للدم هي A وB وAB وO.

وتتحدد مجموعة الدم بوجود أو انعدام جزيئات خاصة تدعى بالمتسضدات antigens على سطوح خلايا الدم الحمر وجزيئات أخرى تدعى بالأجسام المضادة antibodies في بلازما الدم.

وتتوارث العوامل المحددة لمجموعة الدم في الشخص. وإن وجود أو انعدام المستضدات A وB هو الذي يحدد مجموعة الدم. إذ أن خلايا الدم الحمر قد تحتوي على المستضد A أوB أو كليهما، أو قد لا تحتوي على المستضدين. ويوضح الشكل-٨١ هذه الاحتمالات.

قد يحتوي الدم على أجسام مضادة تعمل على تكتل أوتلازن agglutination خلايا الدم الحمر الغريبة عن الدم. ويوضح الجدول-٣٩ توزيع نوعين من الأجسام المضادة (المضاد anti - A والمضاد anti - B) في مجاميع الدم الأربعة. أما الجدول-٤٠ فيظهر النسب المئوية لمجاميع الدم في المجتمع البشري للولايات المتحدة الأمريكية.

الجدول – ٣٩: مجاميع الدم ABO في الإنسان

مجموعة الدم	المتسضد الموجـود على سطح الخلية الحمراء	الجسم المضاد الموجود في بلازما الدم
A	A	المضاد – B
B	B	المضاد – A
AB	A و B	————
O	———	المضاد – A والمضاد – B

الجدول –٤٠: توزيع مجاميع الدم في المجتمع البشري للولايات المتحدة الأمريكية (٪)

مجموعة الدم	القوقازيون	السود	الصينيون	الأمريكان الأصليين
O	٤٥	٤٨	٣٦	٢٣
A	٤١	٢٧	٢٨	٧٦
B	١٠	٢١	٢٣	صفر
AB	٤	٤	١٣	١

ولا بد من الإشارة إلى أن البلازما تحتوي على أجسام مضادة لا تعمل على تلازن خلايا الدم الحمر للفرد نفسه. لذا يمكن نقل الدم من شخص إلى آخر في حالة تطابق مجموعتي الدم. وفي حالة نقل خلايا دم حمر غريبة عن الشخص المستلم للدم فإنها ستتفاعل مع الأجسام المضادة الموجودة في دم الشخص المستلم recipient`s blood مؤدية إلى تلازن خلايا الدم الحمر الغريبة.

إن المستضدات المحدّدة لمجاميع الدم الأربعة هي نتيجة لعملية التعبير عن ثلاث

جينات هي O و A و B. وإن الجينات السائدة هي A و B. ولا يمكن للتحليل الكيمياوي تمييز النمط الوراثي AA عن AO والنمط الوراثي BB عن BO. لذا تتميز هذه الأنماط الوراثية على أنها أنماط مظهرية phenotypes نوع A و B بالرغم من وجود ستة أنماط وراثية هي OO و AO و AA و BO و BB و AB، أما الأنماط المظهرية الأربعة فهي A و B و AB و O. وباستعمال الأنماط المظهرية للأباء المذكورة في الجدول-٤١ حدد جميع الأنماط الوراثية المحتملة للأباء والأطفال وكذلك جميع الأنماط المظهرية للأطفال.

د- بعض الخصائص أو الصفات الأخرى المتوارثة

حاول تحديد النمط المظهري والأنماط الوراثية المحتملة الخاصة بك لكل من الصفات التي سيتم ذكرها في هذا المجال. ولا بد من الإشارة إلى أن الصفة السائدة الخاصة بك قد تكون متماثلة الزيجات homozygous أو مختلفة الزيجات heterozygous. ونظراً لعدم معرفتك ببقية أفراد العائلة فإنك سوف لن تعرف فيما إذا كنت تحمل الأليل المتنحي للجين. وفي هذه الحالة يمكنك استعمال العلامة (-) للإشارة إلى الأليل الثاني غير المعروف (مثلاً XX مقابل-X). ومن ناحية أخرى إذا كنت تمتلك صفة متنحية فإنك سوف تحمل الأليلين المتنحيين . سجل النمط المظهري والأنماط الوراثية المحتملة الخاصة بك للصفات الآتية المذكورة في الجدول-٤٢.

١- الأصابع المتشابكة Interlocking Fingers

عندما يقوم الأشخاص بمشابكة الأصابع مع بعضها فإن عدداً منهم يضع الإبهام الأيسر على قمة الإبهام الأيمن (الصفة السائدة؛ الأليل F)، بينما يعمل الآخرون على وضع الإبهام الأيمن على الإبهام الأيسر (الأليل المتنحي f).

٢- الذقن المرصوع Dimpled Chin

تعد رصعة الذقن صفة سائدة (أليل الرصعة هو D). أما غيابها فيعد صفة متنحية (الأليل d).

الجدول – ٤١: توارث مجاميع الدم في الإنسان

الأنماط المظهرية للأباء		الأنماط الوراثية للأباء		الأنماط الوراثية للأطفال	الأنماط المظهرية للأطفال
الأم	الأب	الأم	الأب		
A	O				
A	B				
B	O				
AB	A				
AB	B				
AB	O				
O	O				

الجدول – ٤٢: صفات أخرى متوارثة

الصفة	النمط المظهري	الأنماط الوراثية المحتملة
الأصابع المتشابكة		
الذقن المرصوع		
القزحية الملونة		
شعر منتصف الإصبع		
الإصبع الصغير المنحني		

٣- القزحية الملونة Pigmented Iris

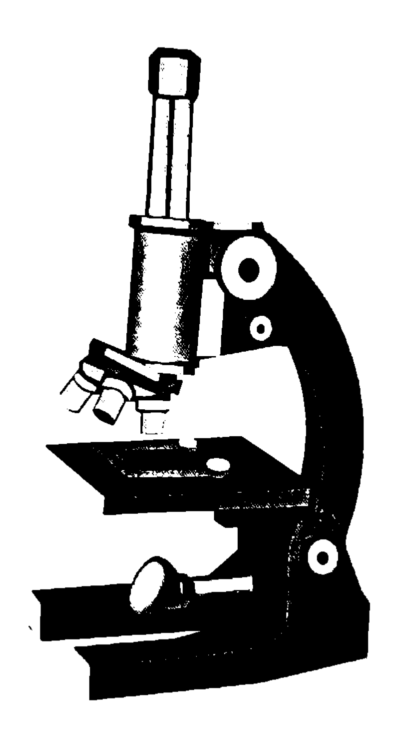
عندما تكون هذه الصفة متنحية (النمط الوراثي pp) لا توجد صبغة في مقدمة العين، وتظهر طبقة زرقاء في ظهر القزحية. لذا تكون العيون زرقاء. أما إذا كان هناك أليل سائد واحد في الأقل (P-) فإن الصبغة في العين ستحجب اللون الأزرق بدرجات متفاوتة اعتماداً على بقية الجينات المنظمة لكمية هذه الصبغة التي تحجب اللون الأزرق. لذا قد يكون لون العين بنياً brown أو بنفسجياً violet أو أخضراً green أو بندقياً hazel أو أي لون آخر، وهذا يعتمد على كمية هذه الصبغة وكثافتها.

٤- شعر منتصف الإصبع Mid – Digit Hair

يمتلك بعض الأفراد شعراً على القطعة (السلامية) الوسطى أو الثانية لإصبع واحد أو أكثر من أصابعهم. ويعود انعدام الشعر الكامل إلى الأليل المتنحي m، أما الصفة السائدة فتعود إلى الأليل M. نظراً لكون الشعر ناعماً جداً في طبيعته لذا تستلزم الحاجة لاستعمال مكبرة زجاجية أو عدسة يدوية لتحديد وجود هذا الشعر أو انعدامه.

٥- الإصبع الصغير المنحني Bent Little Finger

يؤدي الأليل السائد B إلى انحناء المفصل الأخير من الإصبع الصغير نحو الداخل باتجاه الإصبع الرابع. أما وجود الأليل المتنحي b فيؤدي إلى استقامة الإصبع الصغير. ولتحديد فيما إذا كان لديك مثل هذه الصفة دع يدك على المنضدة بشكل مسطح وحاول إرخاء عضلاتك.



المختبر الثالث عشر

التعبير عن فعالية الجين

Expression of Gene Activity

إن الحقبة الحالية للوراثة الجزيئية وتقنية DNA المتحد ثانية recombinant DNA technology قد بدأت بصياغة موديل واتسون وكريك حول التركيب الجزيئي للحامض النووي الرايبوزي مزال الأوكسجين DNA. وهناك ثلاث نواحي تجعل DNA مادة غير اعتيادية:

* إن DNA عبارة عن جزيئة كبيرة جداً منتظمة الحجم والصلابة والشكل.

وإن التغيرات الكثيرة المحتملة في التركيب الداخلي لـ DNA تكسبه التعقيد اللازم لنقل المعلومات.

* يمكن لـ DNA أن يعمل نسخة مماثلة منه، أي أنه يمكن تناسخ نفسه.

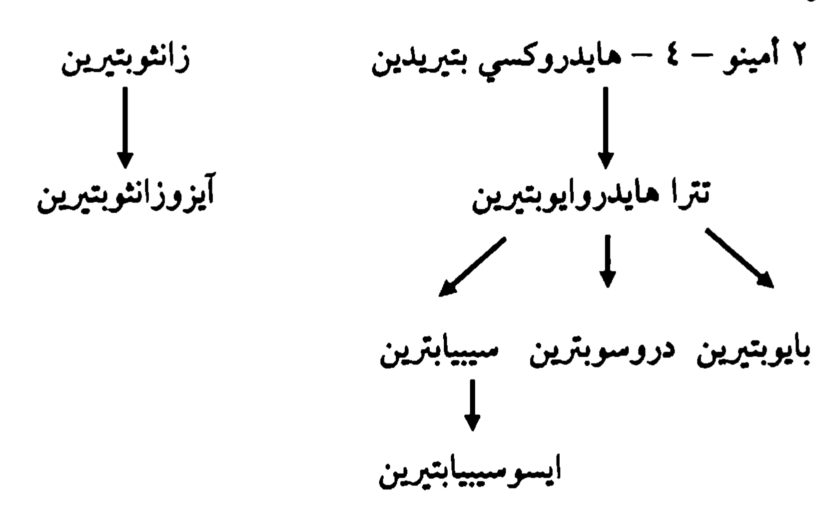
إن المعلومات الموجودة في التركيب الكيمياوي لـ DNA يتم نقلها من النواة إلى السايتوبلازم في الخلايا حقيقية النواة eukaryotes أو إلى بقية أجزاء الخلية في الخلايا بدائية النواة prokaryotes، حيث تستعمل هذه المعلومات في تخليق البروتينات التي تسيطر على سلوك الخلية.

أ- الفصل الكروماتوكرافي لصبغات عين الدروسوفيلا

لقد قدم جورج و. بيدل George W. Beadle وادوارد ل. تاتم Edward L. Tatum عام ١٩٤١ أدلة تجريبية تعزز من المفهوم القائل بأن الجينات تسيطر على الفعاليات الكيمياوية للخلية من خلال السيطرة على تكوين البروتينات المعروفة بالإنزيمات. وإن الإنزيمات تحفز العديد من التفاعلات الكيمياوية الجارية في الخلايا والتي يتم التعبير عنها فيما بعد في الشكل المظهري للكائن الحي البالغ وفي فسلجته وكيمياء حياتيته وسلوكه.

إن تلوين عين ذبابة الفاكهة المسماة دروسوفيلا ميلانوكاستر *Drosophila melanogaster* يخضع للسيطرة الوراثية. إذ يرتبط اللون الأحمر للعين في هذه الحشرة بوجود سلسلة من المواد تدعى البتيريدينات pteridines. وقد تم اختيار هذا المصطلح وذلك لأن المواد الأولى في هذه المجموعة من المركبات قد تم استخلاصها من

أجنحة الفراشة butterfly wings. ويمكن فصل هذه المركبات بسهولة بواسطة الكروماتوكرافي، وعند النظر إليها تحت الأشعة فوق البنفسجية فإنها تولد أنماطاً فلورسنية متميزة في النوع البري wildtype من الدروسوفيلا (الشكل-٨٢). وتوجد البتيريدينات في العديد من اللافقريات وفي خلايا صبغية معينة في البرمائيات والأسماك وفي النباتات (والتي يمكن أن تسهم فيها بعملية التركيب الضوئي). وإن مسار تخليق البتيريدين غير مفهوم بشكل جيد إلا أنه قد تم التعرف على بعض الخطوات.



إن أنماط البتيريدين pteridine patterns في الذباب ذو الألوان العينية الطافرة mutant eye colors تختلف عن تلك الموجودة في الذباب ذو النوع البري. إذ يلاحظ في هذا النوع من الذباب فقدان بتيريدينات معينة طبيعية من النوع البري، بينما يمكن ملاحظة بتيريدينات أخرى ولكن بكميات كبيرة غير اعتيادية.

لقد تم عزل نوعين من الذباب الطافر mutants الذي يحتوي على عيون بنية حمراء باهتة dull reddish - brown بدلاً من العيون الحمراء المتألقة bright red في الذباب الاعتيادي. وإن الجينين المسؤولين عن هذه الصفة يتواجدان في موقعين في التركيب الجيني أو الوراثي genome للدروسوفيلا. ويقع أحد الجينين المسمى بالشبيه بالأحمر الداكن maroon like على الكروموسوم الأول (كروموسوم الجنس)

(الكروموسوم ١ chromosome)، بينما يقع الجين الآخر المسمى بالوردي rosy على الكروموسوم الثالث (chromosome III) . وقد أوضح التحليل الأنزيمي أن النوعين الطافرين من الذباب يفتقدان إنزيم الزانثين دي هايدروجينيز xanthine dehydrogenase وهو الإنزيم المسؤول عن تحويل ٢ – أمينو – ٤ – هايدروكسي بتيريدين إلى آيزوزانثوبتيرين isoxanthopterin. ونتيجة لنقص هذا الإنزيم يتراكم ٢ – أمينو – ٤ – هايدروكسي بتيريدين في الذباب الطافر، بينما يحتوي الذباب من النوع البري على كمية قليلة من هذه المادة أو قد لا يحتوي عليها، إلا أنه يحتوي على كميات معينة من ايزوزانثوبتيرين. وإن هذا المثال يعزز من الرأي القائل بأن الجينات تحدث تأثيراتها من خلال تأثير الإنزيمات.

سيقوم كل طالب في هذه الجزء من المختبر بتحليل البتيريدينات كروماتوكرافياً في ذبابة الفاكهة الطبيعية (النوع البري) ومقارنة النوع البري مع عدة أنواع طافرة mutant ذات عيون ملونة لإثبات أن طفرات العيون الملونة يصاحبها تغيرات في أنماط البتيريدين.

١- خذ صفيحة كروماتوكرافي الطبقة الرقيقة المحتوية على السيليكا جيل بأبعاد ٢٠سم × ٢٠سم وارسم خطاً بقلم الرصاص موازياً لإحدى حافات الصفيحة وبمسافة ٢٥ ملم عن حافة الصفيحة (الشكل-٨٣). امسك الصفيحة من الحافات قدر الإمكان وذلك لأن بصمات الأصابع تؤثر على عملية الفصل.

٢- حاول الحصول على ثلاث ذبابات من النوع البري وثلاث من النوع الطافر الوردي rosy وثلاث من النوع الطافر الشبيه بالأحمر الداكن maroon like وثلاث من نوع واحد أو أكثر من الأنواع الطافرة الآتية:

البني الداكن	Sepia
البني	Brown
الأرجواني المزرق الداكن	Plum
القرمزي	Scarlet

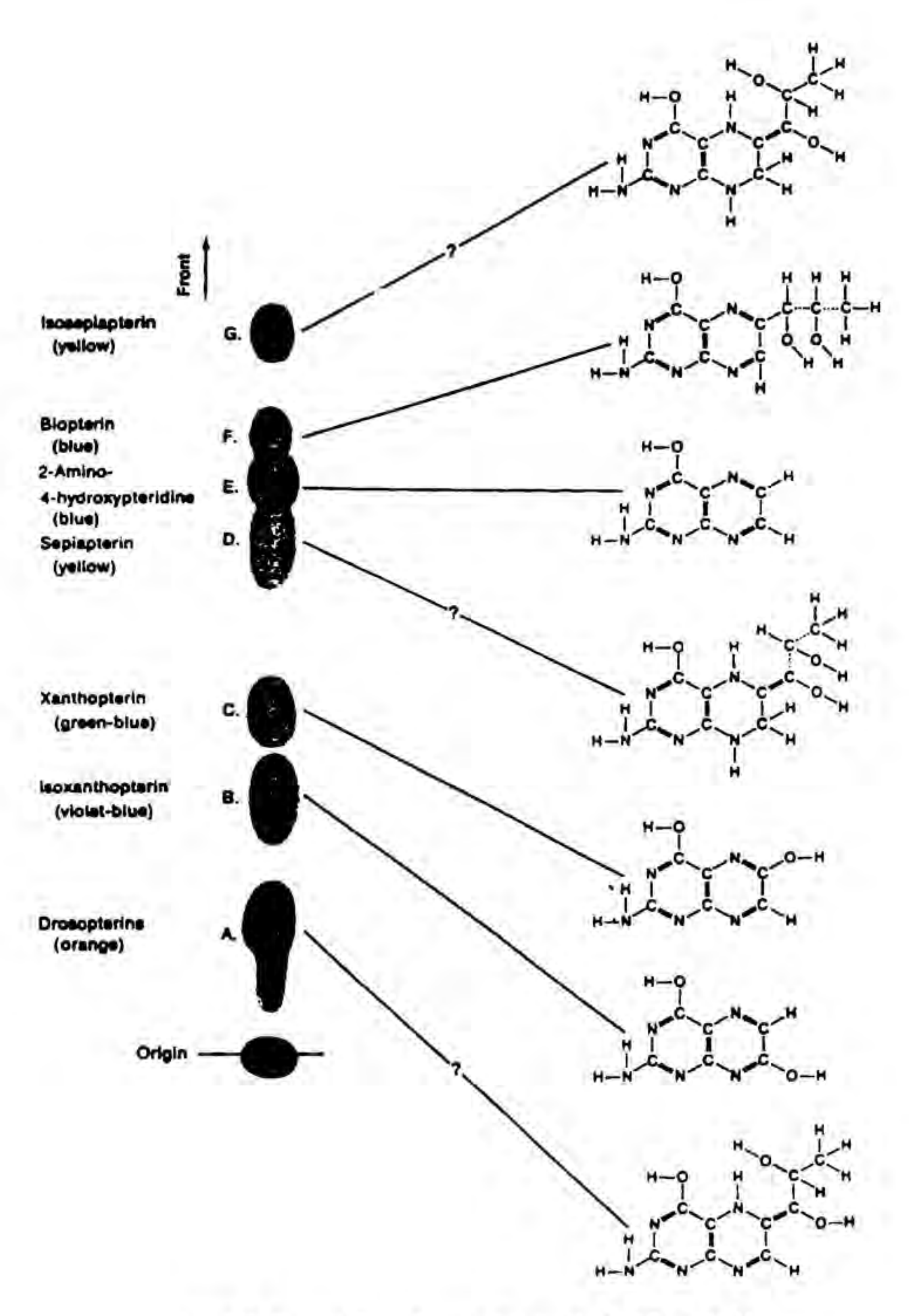
الأحمر الزاهي	Cinnabar
القرمزي	Vermilion
الأحمر (الأيوسين)	Eosin
المشمشي	Apricot
الأبيض	White

ونظراً لوجود اختلافات في البتيريدينات بين الذكور والإناث لذا لا بد من استعمال ذباب من الجنس نفسه لإجراء التحليلات الآتية. ويمكنك اختيار الذكور البالغة أو الإناث البالغة.

يحتوي النوع البري لذبابة الفاكهة على عيون حمراء داكنة، ويكون لون الجسم أسمر مغطى بأهلاب يحتوي على زوج طويل من الأجنحة المستقيمة التي تتجاوز نهاية البطن (الشكل-٨٤). ويكون جسم الذكر أصغر نوعما من جسم الأنثى، وتكون بطن الذكر مستديرة ومصبوغة، وتحتوي أرجل الذكر الأمامية على خصلة من الأهلاب تدعى بمشط الجنس "sex comb". أما بطن الأنثى فتكون مدببة نوعما وتحتوي على العديد من الخطوط الداكنة، وقد تحتوي على خصلة من أهلاب قصيرة.

٣- خدر بالإيثر etherize ثلاث أنواع برية من الذباب وضعها في قنينة تحتوي على ٠,٢٥ مل من مذيب الكروماتوكرافي. إسحق هذه الذبابات باستعمال قضيب زجاجي لإذابة الصبغات. ومن خلال استعمال أنبوبة شعرية أضف بضع قطرات من مستخلص الذباب إلى السيليكا جيل كما موضح في الشكل-٨٣. أترك البقعة تجف بين إضافة وأخرى. احترس من الإخلال بغطاء السيليكا جيل. وضع العلامات المناسبة على صفيحة السيليكا جيل لكي تساعد في التشخيص. كرر هذه الطريقة لكل نوع طافر من العيون الملونة. ما هي عينة السيطرة الواجب استعمالها ؟.

أضف عينة السيطرة إلى صفيحة كروماتوكرافي الطبقة الرقيقة.



شكل – ٨٢: أنواع جزيئات Pteridines في ذبابة الفاكهة

٤- أترك البقع بضع دقائق لكي تجف. ثم ضع صفيحة السيليكا جيل في المذيب الموجود في إناء الكروماتوكرافي (الشكل-٨٣). ونظراً لحساسية البتيريدينات للضوء لا بد من إجراء عملية تظهير مخططات الكروماتوكرافي chromatograms في غرفة مظلمة (أو تغطية إناء الكروماتوكرافي برقاقة معدنية foil).

٥- أترك مخطط الكروماتوكرافي لكي يتظهر (يتحمض) develop لغاية وصول المذيب إلى مسافة تتراوح ٣,٥ سم من قمة صفيحة الكروماتوكرافي.

٦- حاول إخراج الصفيحة من الإناء، وحدد حافة المذيب بقلم رصاص وأترك الصفيحة لكي تجف لبضع دقائق. ثم افحص الصفيحة باستعمال الضوء فوق البنفسجي ultraviolet light ذو الموجات الطويلة (٣٦٠ نانومتر).

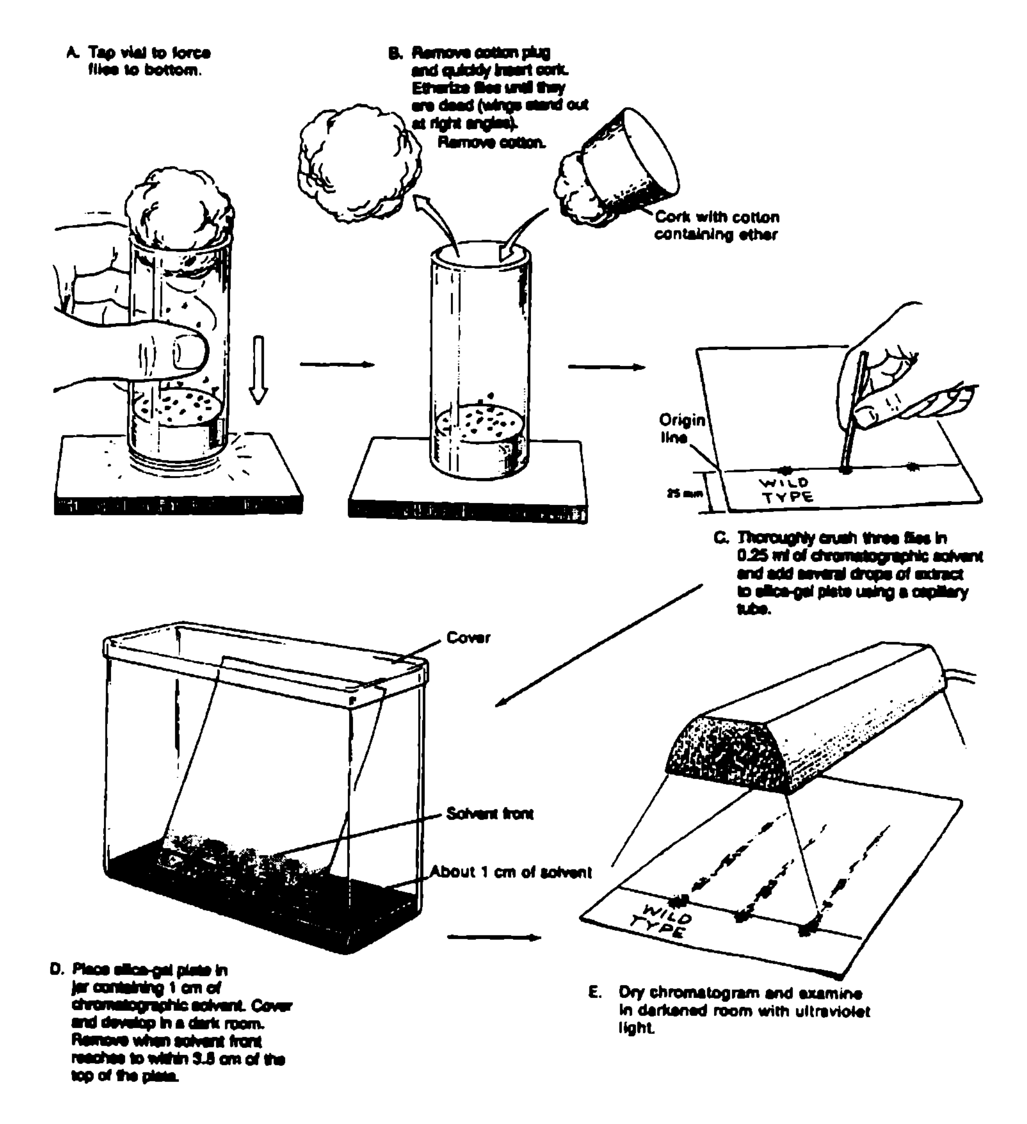
تحذير: لا تنظر مباشرة إلى مصباح الأشعة فوق البنفسجية. البس النظارات الوقائية لحماية عينيك من انعكاسات الأشعة فوق البنفسجية من منضدة المختبر.

لاحظ الألوان المتألقة fluorescent colors لمختلف البتيريدينات (الشكل-٨٢). حدد كل بقعة باستعمال قلم الرصاص. ويوضح الجدول-٨٢ البتيريدينات مرتبة تبعاً لطريقة انفصالها على مخطط الكروماتوكرافي في بحيث أن آخر بتيريدين مثبت في القائمة يمثل البتيريدين الموجود في أسفل مخطط الكروماتوكرافي قرب المنشأ. ضع إشارة على البتيريدينات الموجودة في الذباب الذي فحصته من خلال التدقيق في المربعات المذكورة في الجدول-٤٣. احسب قيم R_f لكل من البتيريدينات المعزولة في مخطط الكروماتوكرافي ثم سجل هذه القيم في الجدول-٤٤.

هل تُظهر مخططات الكروماتوكرافي للذباب ذو العيون البنية الداكنة - sepia eyed flies وجود بتيريدينات بكميات أكبر من تلك الموجودة في النوع البري ؟ وإذا كانت موجودة فما هي هذه الصبغات ؟.

ما هي البتيريدينات التي لاحظتها أو لاحظها زملائك في ذكور وإناث الذباب الطافر ذو العيون الملونة من النوع الوردي والشبيه بالأحمر الداكن ؟.

اشرح أي اختلافات تمت ملاحظتها.



شكل-٨٣: طريقة عزل جزيئات pteridines بالكروماتوغرافيا

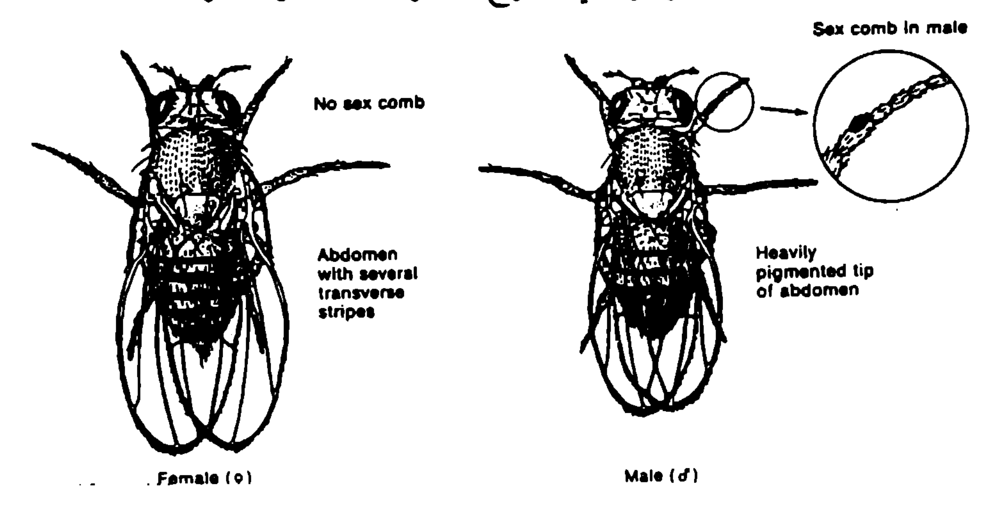
ناقش طفرات العيون الملونة على أساس السيطرة الوراثية لتخليق الإنزيم وفعاليته.

إذا سمح الوقت بذلك ومن خلال استعمال هذه التقنية أجب على الأسئلة الآتية:

* هل إن لذكور وإناث الذباب البالغ أنماط البتيريدين نفسه ؟.

* هل تتغير أنماط تخليق البتيريدين في أثناء تطور الذبابة من البيضة إلى البالغة ؟.

* هل توجد اختلافات صبغية في الأنواع الطافرة ذات الجسم الملون body – color mutants مماثلة لتلك الموجودة في الأنواع الطافرة ذات العيون الملونة ؟.



شكل – ٨٤: ذبابة الفاكهة البالغة *Drosophila melanogaster*

ب- حث الطفرة بواسطة الضوء فوق البنفسجي

إن القابلية على الطفرة تكون متأصلة في المادة الوراثية لجميع الكائنات الحية والفايروسات. وبالرغم من حدوث الطفرات بشكل تلقائي إلا أنه يمكن زيادة تكرار حدوثها بعدد من العوامل التي تدعى بمولدات الطفرة mutagens. ومن العوامل المستعملة على نطاق واسع لتوليد الطفرة هي الضوء فوق البنفسجي والذي يُحدث تأثيراته الطافرة بصورة جزئية في الأقل من خلال تكسيره للكروموسومات مما يؤدي إلى فقدان أجزائها أو إعادة ترتيب أجزائها.

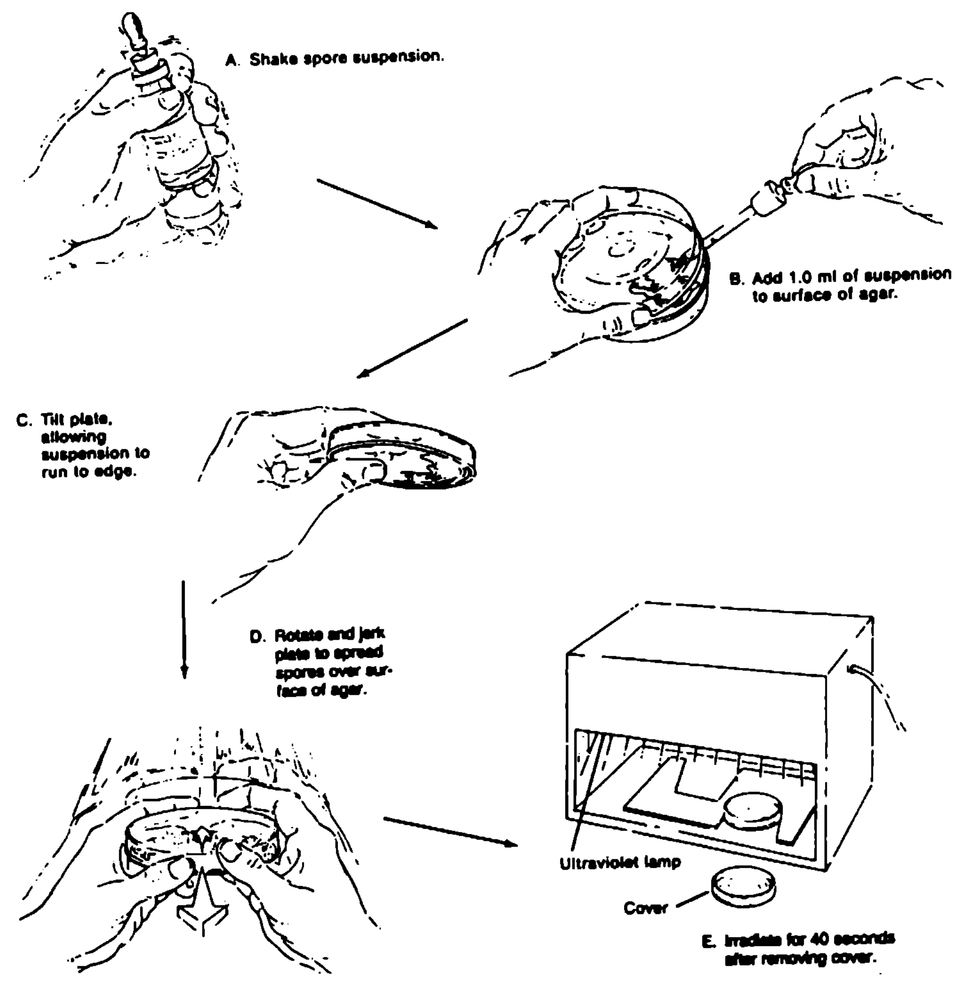
سيتم في هذه التجربة استخدام الأشعة فوق البنفسجية لدراسة معدل الطفرة في فطر البنسيليوم *Penicillium* المولد للمضاد الحيوي. وسوف تتحدد هذه الدراسة بطفرات يسهل الكشف عنها كالشكل واصطباغ المستعمرة وتأثيرات على معدل النمو (لاحظ الشكل-٨٥).

الجدول – ٤٣: توزيع البتيريدينات في النوع البري في الدروسوفيلا وفي النوع الطافر ذو العيون الملونة

البتيريدين (اللون)	النوع البري الجنس: ــــ	النوع الطافر				
		الوردي الجنس: ــــ	الشبيه بالأحمر الداكن الجنس: ــــ	ــــ الجنس: ــــ	ــــ الجنس: ــــ	ــــ الجنس: ــــ
الآيسوسيبيابتيرين (أصفر)						
البايوبتيرين (أزرق)						
٢-أمينو-٤- هايدروكسي بتيريدين (أزرق)						
السيبيابتيرين (أصفر)						
الزانثو بتيرين (أزرق مخضر)						
الآيسوزانثوبتيرين (أزرق بنفسجي)						
الدروسوبتيرينات (برتقالية)						

الجدول – ٤٤: حساب قيم R_f لصبغات البتيريدينات في النوع البري من *D. melanogaster*

الصبغة	المسافة من المنشأ إلى مركز البقعة	المسافة من المنشأ إلى حافة المذيب	قيم R_f
الآيسوسيبيابتيرين			
البايوبتيرين			
٢-امينو-٤ هايدروكسي بتيريدين			
السيبيابتيرين			
الزانثوبتيرين			
الآيسوزانثوبتيرين			
الدروسوبتيرينات			



شكل – ٨٥: تشعيع سبورات فطر البنسيليوم للأشعة فوق البنفسجية

١- بالتعاون مع زميلك حاول الحصول على طبقي بتري petri plates يحتويان على الأكار الغذائي nutrient agar. علّم (ضع علامة) أحدهما بالسيطرة control والآخر بالأشعة فوق البنفسجية UV ثم ضع اسمك واسم زميلك والتاريخ ورقم الشعبة في المختبر.

٢- أضف ١ مل من معلق سبورات البنسيليوم لكل طبق وكما يأتي:

أ- رج الدورق المحتوي على السبورات (الأبواغ) spores بلطف لتعليق المحتويات بشكل متجانس.

ب- أضف ١ مل (٢٠ قطرة) من معلق السبورات (الأبواغ) إلى سطح الأكـار في طبق السيطرة. امسك طبق الأكار عند مستوى عينيك، وحاول نشر المعلق في الطبق باتجاه الحافات من خلال ميلان الطبق.

تحذير: لا تحاول ميلان الطبق كثيراً لتجنب انتشار معلق السبورات (الأبـواغ) إلى حافات الطبق.

جـ- كرر الخطوتين أ، ب بالنسبة لطبق الأشعة فوق البنفسجية.

٣- أترك الطبق لفترة ٣٠ – ٤٥ دقيقة لكي تستقر السبورات (الأبواغ) على الأكار. لا تحاول تحريك الأطباق خلال هذه الفترة.

٤- شعع irradiate طبق الأشعة فوق البنفسجية كما يأتي (الشكل-٨٥).

أ- افتح مصباح الأشعة فوق البنفسجية لبضع دقائق قبل التشعيع.

ب- ضع الطبق مع غطائه تحت مصباح الأشعة فوق البنفسجية.

جـ- ارفع الغطاء وعرّض الطبق للأشعة فوق البنفسجية لفترة ٤٠ ثانية. أعد الغطاء وارفع الطبق من مكانه.

٥- طوّق الطبقين بالبارافيلم parafilm لتقليل فقدان الرطوبة ، ثم ضعهما في حاضنة لفترة أسبوع واحد بدرجة حرارة ٢٨°م. ثم احسب عدد مستعمرات colonies البنسيليوم النامية في حالة طبق السيطرة والطبق المعرض للأشعة فوق البنفسجية. افترض أن كل مستعمرة نشأت من سبور (بوغ) واحد. سجل المعلومات في الجدول-٤٥.

٦- ادرس بدقة ظهور المستعمرات على طبق السيطرة. وهذه تمثل المستعمرات الطبيعية للنوع البري. إذ يجب أن تكون زرقاء مسودة ذات حافة بيضاء ضيقة. افحص الشفافية اللونية color transparencies لمستعمرات النوع البري في حالة توفرها لكي تساعدك في تشخيص الحالة الطبيعية. وفي حالة وجود انحراف لأي مستعمرة عن النوع البري في طبق السيطرة (مثلاً حجم المستعمرة، عرض

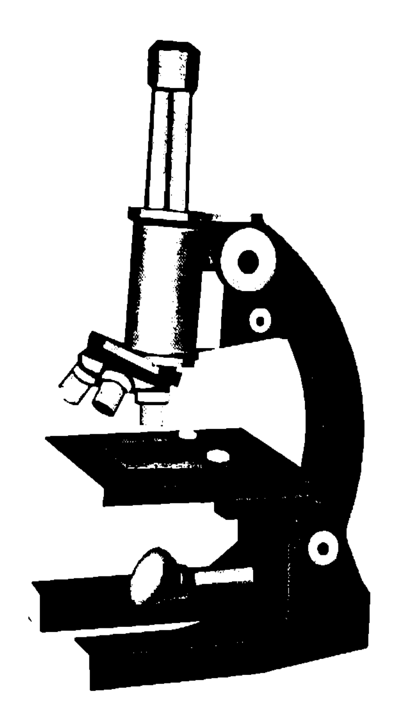
الحافة، اللون، أو المظهر السطحي) فإن هذه المستعمرة تعد طافرة. هل تتوقع وجود مستعمرات طافرة على طبق السيطرة؟ وضح ذلك.

ما هو الدليل على أن الأشعة فوق البنفسجية تعمل على إحداث الطفرات بشكل غير مقيد ؟.

إن الطفرات المدروسة في هذا المختبر قد تم التعبير عنها بشكل تغيرات عيانية مرئية. وربما أن بعض مستعمرات النوع البري تحمل طفرات مستحثة بالأشعة فوق البنفسجية إلا أنها لا تعبّر عنها. وضح ذلك.

الجدول – ٤٥: تأثيرات الأشعة فوق البنفسجية على البنسيليوم

البنسيليوم	معلومات الصف		معلومات المجموعة	
	السيطرة	الأشعة فوق البنفسجية	السيطرة	الأشعة فوق البنفسجية
العدد الكلي للمستعمرات				
عدد المستعمرات الطافرة				
النسبة المئوية للمستعمرات الطافرة				
النسبة المئوية للسبورات الباقية على قيد الحياة بعد التشعيع				



المختبر الرابع عشر

مملكة المونيرا

Kingdom Monera

تتضمن مملكة المونيرا جميع الخلايا بدائية النـواة prokaryotes . وإن أفـراد هـذه المملكة عبارة عن كائنات حية أحادية الخليـة unicellular إلا أنهـا تتجمـع في بعـض الحالات لتكوين خيوط أو تجمعات أخرى من الخلايا. وتختلف الخلايا بدائيـة النـواة عن الخلايا حقيقية النواة بأربعة جوانب مهمة:

١- يلاحظ أن DNA فيها لا ينتظم داخل نواة محددة بغشاء، كمـا أنـه لا يـرتبط مـع بـروتين الهسـتون histone لتكـوين الكرومـاتين chromatin كمـا هـو الحـال في الخلايا حقيقية النواة eukaryotes.

٢- يكون DNA في الخلايا بدائية النواة حلقياً circular، بينما ينتظم في الخلايا حقيقية النواة بشكل كروموسومات متميزة.

٢- تفتقد الخلايا بدائيـة النـواة إلى العضـيات المحاطـة بالأغشـية مثـل المايتوكونـدريا والبلاسـتيدات plastids واللايسوسـومات ومعقـدات كـولجي والشـبكة الأندوبلازمية، كما وتحتوي الأغشية البلازمية للعديد من الخلايـا بدائيـة النـواة على طيات تمتد إلى السايتوبلازم حيث تزيد من المساحة السطحية.

٤- تحتوي جدران الخلايا في معظم الخلايا بدائية النـواة علـى مـادة خاصـة بـالمونيرا تدعى بالببتيدوكلايكان peptidoglycan.

ستقوم في هذا المختبر بدراسة قسمين من المونيرا وكما يأتي.

★ قسم البكتريا الإنشطارية Schizophyta

وهي عبارة عن كائنات وحيدة الخلية تتكاثر عادة لا جنسياً مـن خـلال انقسـام الخلية وتكون تغذيتها في العادة من النوع المختلف التغذيـة heterotrophic (يجـب أن يتوفر في غذائهـا الكـاربوهيدرات والدهون والحـوامض الأمينيـة)، كمـا أن الـبعض منهـا يكـون ذاتـي التغذيـة autotrophic مـن خـلال عمليـة التركيـب الضـوئي photosynthesis.

★ قسم البكتريا الخضراء الزرقاء Cyanobacteria

(كانت تسمى في السابق بالطحالب الزرقاء – الخضراء blue – green algae). وتكون وحيدة الخلية أو بشكل مستعمرات ولها كلوروفيل chlorophyll إلا أنها خالية من البلاستيدات ، وتتكاثر بالإنشطار وتكون في العادة ذاتية التغذية (أي إنها تستطيع تخليق كاربوهيدراتها ودهونها وحوامضها الأمينية).

أ- قسم البكتريا الانشطارية (البكتريا)

Division Schizophyta (Bacteria)

تعد البكتريا الأكثر قدما من بين جميع الكائنات الحية، إذ وجدت متحجراتها في صخور تُعود إلى فترة تتراوح ٣,٥ بليون سنة. أما متحجرات الخلايا حقيقية النواة فتعتقد بأن تاريخها يعود إلى ما قبل ٨٠٠ مليون سنة. وبالرغم من حجمها الصغير وتركيبها البسيط إلا أن البكتريا قد تكيفت للعديد من البيئات. وإنها تتوزع على نطاق واسع في الطبيعة بالمقارنة مع بقية المجاميع من الكائنات الحية ويمكنها البقاء في بيئات لا يمكن لكائنات أخرى أن تعيش فيها. وهناك بكتريا من النوع اللاهوائي الإجباري obligate anaerobes أي أنها يمكنها البقاء والتكاثر بغياب الأوكسجين الحر فقط. أما البكتريا الأخرى المسماة باللاهوائية الاختيارية facultative anaerobes فإنها يمكنها البقاء دون الحاجة للأوكسجين، إلا إنها يمكنها النمو بشكل شديد عند توفر الأوكسجين في البيئة.

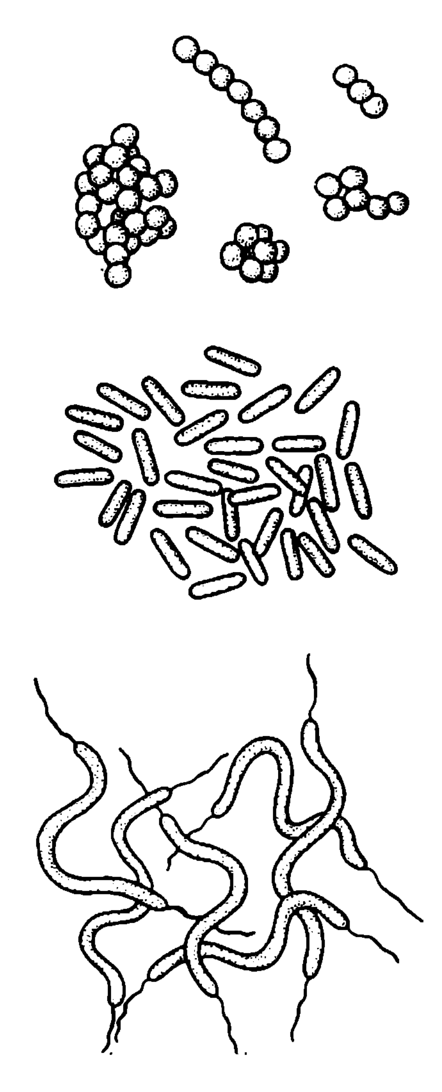
تتوفر البكتريا بشكل خاص في التربة. ويلعب بعض الأنواع منها دوراً مهماً في دورة النتروجين nitrogen cycle والتي يتم فيها تحويل نتروجين الهواء الجوي إلى أملاح نتروجينية يمكن للنبات أن يستعملها لأغراض النمو.

تكون البكتريا مسؤولة عن تحلل المادة العضوية وبالتالي تحرير ثنائي أوكسيد الكاربون والذي يمكن الاستفادة منه في عملية التركيب الضوئي. ومع إن معظم البكتريا تكون مختلفة التغذية heterotrophs إلا أن البعض منها يكون ذاتي التغذية autotrophs. وهناك مجموعة واحدة من البكتريا تكون ضوئية ذاتية التغذية

photoautotrophs ، إذ تحصل على الطاقة لعملية التخليق من خلال تحويل الطاقة الضوئية إلى طاقة كيمياوية بعملية مماثلة للتركيب الضوئي. ويختلف التركيب الضوئي في البكتريا عن ذلك الموجود في الكائنات الحية حقيقية النواة من حيث أن كبريتيد الهيدروجين hydrogen sulfide هو الذي يستعمل كعامل مختزل لثنائي أوكسيد الكاربون بدلاً من الماء. لذا فإن بكتريا التركيب الضوئي photosynthetic bacteria تقوم بتحرير الكبريت بدلاً من الأوكسجين.

توجد مجموعة ثانية من البكتريا الذاتية التغذية (كيمياوية ذاتية التغذية chemoautotrophs) تقوم بتخليق المواد العضوية من ثنائي أوكسيد الكاربون والأمونيا أو النترات باستخدام الطاقة من أكسدة المواد اللاعضوية. فعلى سبيل المثال هناك نوع واحد من البكتريا في التربة يقوم بأكسدة الأمونيا إلى النترات وتوليد الطاقة الضرورية في هذه العملية. وتعد البكتريا الكيمياوية الذاتية التغذية مصانع كبيرة لعمل البروتوبلازم. وهناك أنواع أخرى من البكتريا يتم الاستفادة منها تجارياً في إنتاج الكحول والخل vinegar والمواد الكيمياوية والإنزيمات والمضادات الحيوية والعديد من المنتجات الأخرى. كما وأن هذه الكائنات المجهرية تكون مسؤولة أيضاً عن فساد أو تلف الأغذية food spoilage وتسمم الغذاء والعديد من أمراض الحيوانات المتضمنة التدرن (السل) tuberculosis والحمى القرمزية scarlet fever وذات الرئة pneumonia والخناق diphtheria . وتستعمل البكتريا في الوقت الحاضر في حقل جديد يعرف بالتقنية الحيوية للمتحد ثانية Recombinant Biotechnology. فعلى سبيل المثال تم إدخال الجين البشري المسؤول عن الأنسولين في كروموسوم البكتريا حيث يتم تنشيطه لتكوين الأنسولين البشري. ومن خلال هذه التقنية يتم الحصول على الأنسولين بكلفة منخفضة ، كما أن هذه الطريقة تقلل من احتمالية استجابة الحساسية للأنسولين المعزول من بنكرياس الحيوانات الأخرى. وعليه فإن البكتريا تؤثر بشكل مباشر أو غير مباشر على حياة الإنسان.

توجد معظم أنواع البكتريا بأشكال منفردة الخلايا، إلا أن البعض منها يكوّن مستعمرات colonies أو خيوط من الخلايا المرتبطة مع بعضها بشكل مفكك (الشكل-٨٦): الكروية spherical (coccus).



شكل-٨٦: أشكال البكتريا

(أ) الكروية coccus. (ب) العصوية bacillus. (جـ) اللولبية spirillum.

والعصوية (bacillus) واللولبية (spirillum) spiral. وقد اعتقد لسنوات عديدة بأن البكتريا تتكاثر لا جنسياً بعملية الإنشطار fission، إلا أن ما معروف حالياً هو أن خلايا البكتريا تتبادل موادها الوراثية من خلال عملية التكاثر الجنسي. وقد أوضحت الدراسات أن التكاثر الجنسي يحدث على نطاق واسع بين البكتريا.

ملاحظة:

قبل البدء بهذا المختبر يجب عليك التعرف على طرق التعقيم والتي تعد ضرورية عند التعامل مع الأحياء المجهرية لمنع تلوثك أو تلوث زملائك أو تلوث البيئة.

١- صبغ البكتريا Bacterial Staining:

تكون البكتريا الحية عديمة اللون تقريباً ولا تظهر تبايناً كافياً في الوسط المائي الموجودة فيه بحيث يمكن رؤيتها بوضوح تحت المجهر الضوئي. ولهذا السبب يتم صبغها في العادة لتسهيل رؤيتها بوضوح. وإن الصبغات عبارة عن أملاح تتألف من أيونات سالبة وموجبة الشحنة. ويكون أحد هذه الأيونات ملوناً ويدعى بحامل الصبغة chromophore. فعلى سبيل المثال يتحلل كلوريد المثيلين الأزرق methylene blue chloride كما يأتي:

كلوريد المثيلين الأزرق ←——— المثيلين الأزرق + أيون الكلوريد

إن حامل الصبغة في هذه الصبغة البسيطة هو أيون المثيلين الأزرق ذو الشحنة الموجبة. لذا يعد المثيلين الأزرق صبغة قاعدية basic dye تتفاعل مع مكونات الخلية السالبة الشحنة مثل الحوامض النووية وبعض السكريات المتعددة. وتدعى الصبغات القاعدية في بعض الحالات بالصبغات النووية nuclear stains وذلك لأنها تصبغ نوى الخلايا. أما الصبغات التي يكون فيها حامل الصبغة أيون سالب فتدعى الصبغات الحامضية acidic stains. إذ إنها تتفاعل مع مكونات الخلية الموجبة الشحنة (العديد من البروتينات)، وبذلك فإنها تصبغ السايتوبلازم فقط. لذا فإنها تدعى بالصبغات السايتوبلازمية cytoplasmic stains. ومع أن هناك العديد من التقنيات لصبغ البكتريا، إلا أنك سوف تستعمل الصبغات البسيطة والصبغات التفاضلية differential stains وإحدى الصبغات التي تحدد طبيعة المواد المخزونة في خلية البكتريا.

أ- تهيئة الشرائح Preparation of Slides

تستدعى الحاجة إلى شرائح نظيفة للحصول على مستحضرات جيدة. وهناك طريقتين لتنظيف الشرائح يمكن اختيار واحدة منها وكما يأتي:

★ باستعمال الكحول

امسح سطحي الشريحة بالكحول، ثم اترك الشريحة لكي تجف. بعدها امسك الشريحة بملقط ومررها على لهب مصباح كحولي للتخلص من الكحول المتبقي. بعد ذلك اترك الشريحة الساخنة لكي تبرد.

ملاحظة:

امسك الشريحة النظيفة دائماً من حافتها. وإن المواد الدهنية في الأصابع تؤدي بالماء إلى تكوين قطرات تتداخل مع الانتشار المتجانس للبكتريا على الشريحة ويمكن أن تتداخل مع التصاق البكتريا بالشريحة في أثناء عملية التثبيت بالحرارة.

★ باستعمال منظف

رطّب إصبعك ثم امسحه على لوحة المنظف مثل اللافا lava أو الفيلز نبثا Felse Naptha. بعدها امسح المعجون المتكون على سطحي الشريحة. أترك المعجون paste لكي يجف في الهواء ثم امسحه باستعمال ورقة نشاف نظيفة .

ب- تثبيت البكتريا على الشرائح Fixing Bacteria to Slides

قبل صبغ البكتريا لا بد من عمل مسحات لها على الشرائح وتثبيتها. وفي حالة عدم تثبيت البكتريا على الشريحة فإنها ستزال في أثناء عملية التصبيغ. وإنك سوف تستعمل طريقة تثبيت البكتريا الموضحة في الشكل ٨٧ والخاصة بالبكتريا المأخوذة من المزرعة السائلة (البروث) broth (liquid) culture . ويمكن استعمال الطريقة نفسها على مزارع البكتريا النامية على الأكار agar. حاول الحصول على مزارع

بكتيرية من المدرس ثم ثبت مسح البكتريا على ثلاث أو أربع شرائح كما موضح في الشكل-٨٧. علّم الشرائح بأسماء البكتريا المستعملة.

جـ- الصبغة الموجبة (القاعدية) Positive (Basic) Staining

سوف تستعمل في هذه الطريقة المثيلين الزرقاء لصبغ المستحضر الخاص بالبكتريا.

١- ضع الشرائح التي تم تثبيتها على لوحة مشبكة أو أي مسند آخر (الشكل- ٨٨).

٢- ضع قطرات من صبغة المثيلين الزرقاء لتغطية المسحة بشكل كامل.

٣- أترك الصبغة لفترة ٦٠ ثانية.

ملاحظة:

في حالة جفاف الصبغة على الشريحة، أضف قطرات أخرى من الصبغة. لا تترك الصبغة تجف.

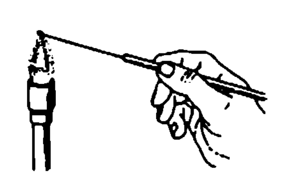
٤- اغسل الصبغة من الشريحة بدقة وباستعمال الماء المقطر (الشكل-٨٨).

٥- تخلص من الماء الزائد من الشريحة من خلال وضع ورقة نشاف أو أي ورق ماص آخر على إحدى زوايا الشريحة. ثم جفف الشريحة بين ورقتي نشاف (الشكل- ٨٨).

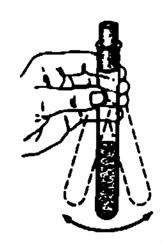
٦- افحص المستحضرات باستعمال العدسة الزيتية.

ملاحظة:

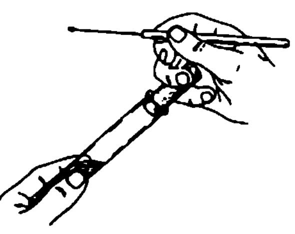
(سيوضح لك المدرس كيفية استعمال هذه العدسة). وفي حالة عمل المسحة بشكل جيد فإنه سيمكنك من ملاحظة الخلايا البكتيرية الفردية.



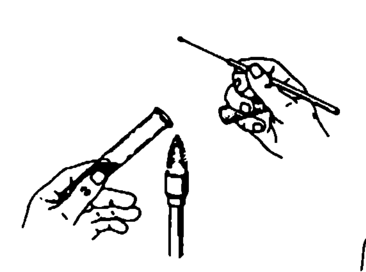
A. Insert inoculating loop into upper cone of flame. Heat entire wire to redness.



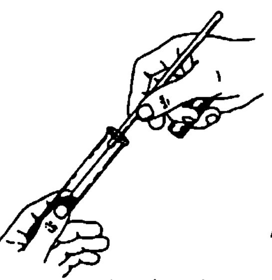
B. While holding the loop, pick up culture tube with free hand. Shake tube gently from side to side.



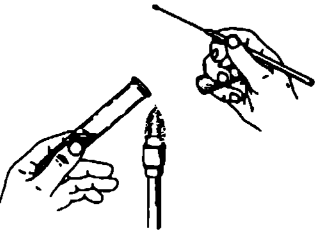
C. Remove cap or plug from tube with free fingers of the hand holding the loop. Hold cap in your fingers. Do not put cap down.



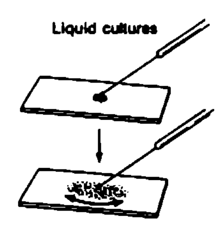
D. Quickly pass top of tube through flame.



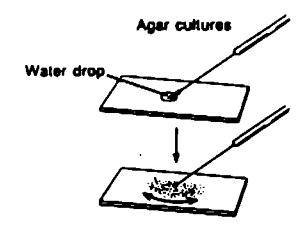
E. Insert sterilized loop into culture and remove small amount of culture. *Note:* Because the loop is hot, you may hear a sizzling noise. Do not be disturbed by this.



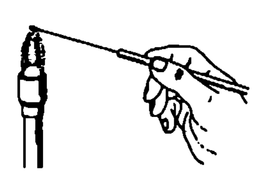
F. Reflame the tube and replace the cap or plug.



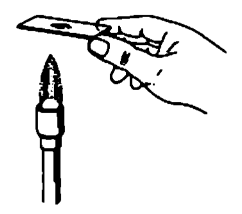
G. If you are transferring from a liquid culture, place the loopful of culture on the slide and spread it over a small area. Allow this smear to air-dry.



H. If you are using an agar culture, place a drop of water on a slide and mix a small amount of culture into it. Spread the culture over a small area and air-dry.

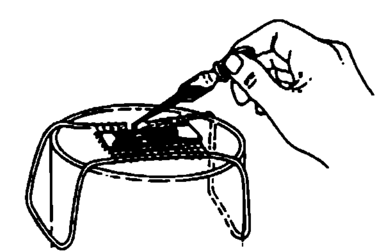


I. Reflame the inoculating loop to redness and put away or down on table.

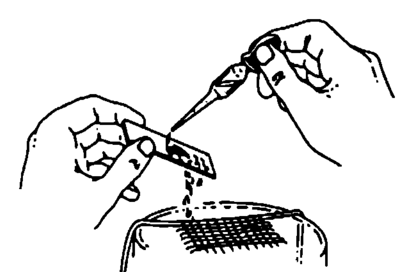


J. Pass the slide (smear uppermost) through the flame several times quickly. Do not overheat.

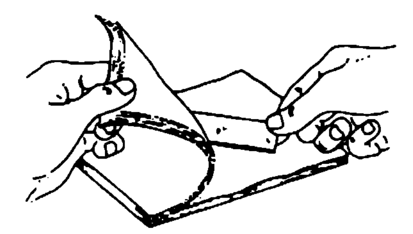
شكل – ٨٧: تحضير مسحة بكتريا bacteria smears



A. Add the methylene blue stain dropwise until the entire smear is covered. Stain for 60 seconds.



B. Wash off the stain.



C. Remove excess water by touching one end of the slide to absorbent paper, and then dry the slide between pieces of the paper.

شكل – ٨٨: طريقة صبغ مسحة البكتريا

د- الصبغة السالبة (الحامضية) Nagative (Acidic) Staining

إن من أمثلة الصبغات الحامضية المستعملة في هذه الطريقة هي النكروسين nigrosin (أو أيوسينات الصوديوم sodium eosinate أو الفوكسين الحامضي acid fuchsin أو الكونغو الأحمر Congo red). وإن حامل الصبغة في هذه الصبغات هو الأيون السالب الشحنة. ونظراً لأن معظم خلايا البكتريا تحمل شحنة سالبة لذا فإن الصبغة لا تدخل إلى الخلايا بل تكوّن ترسبات حولها. وعليه تظهر الخلايا بشكل

تراكيب رائقه عديمة اللون على أرضية غامقة. ومن السهولة نسبياً ملاحظة حجم الخلية وشكلها في مثل هذه الحالات.

١- انقل باستعمال العروة loop بكتريا الأيشيريشيا القولونية *Escherichia coli* أو بكتريا أخرى إلى شريحة نظيفة (لا تعمل مسحة لهذه البكتريا).

٢- ضع قطرة من محلول النكروسين وأمزجها مع معلق البكتريا ولا تعمل مسحة لهذا المزيج (الشكل-٨٩).

٣- انشر المعلق على الشريحة بهدوء من خلال اتباع الطريقة الموضحة في الشكل-٨٩.

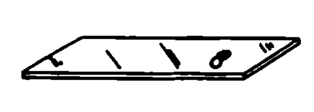
٤- جفف المسحة في الهواء ولا تحاول التسخين.

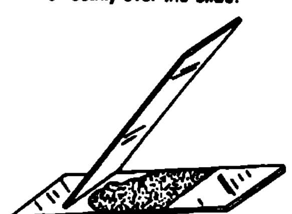
٥- افحص الشريحة تحت المجهر. وفي حالة عمل المسحة بشكل جيد يمكنك ملاحظة التدرج في سمك المسحة من إحدى نهايتي الشريحة إلى النهاية الأخرى. ويمكن أن تكون المسحة سميكة في إحدى النهايتين بحيث لا يمكنك ملاحظة التفاصيل (في الشكل-٨٩). إما في النهاية الأخرى فيمكن أن تكون المسحة رقيقة جداً بحيث لا يمكن ملاحظة التباين. وفي مواقع معينة من الشريحة يمكن أن يكون سمك المسحة بالقدر الكافي بحيث يعطي تبايناً واضحاً يمكن من خلاله ملاحظة الخلايا الفردية على أرضية غامقة (في الشكل-٨٩).

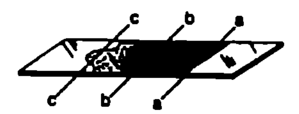
هـ- صبغة كرام The Gram Stain

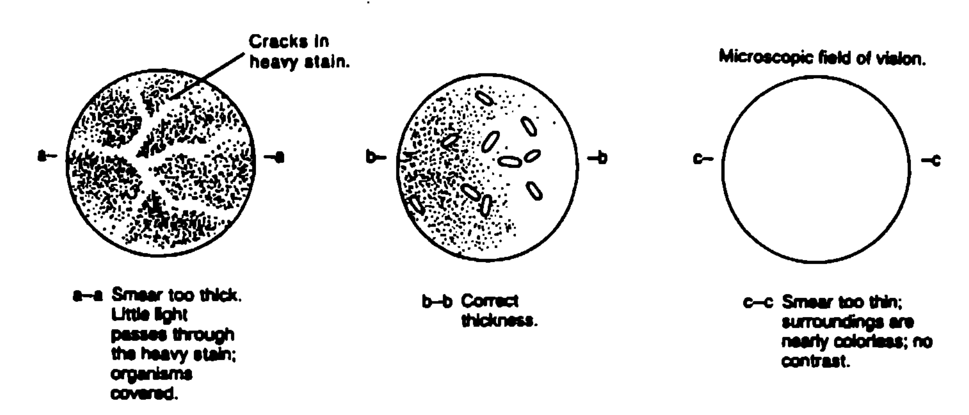
تعد طريقة الصبغة هذه من إحدى طرق الصبغات الواسعة الاستعمال في مجالات علم الأحياء المجهرية. وتعد صبغة تفاضلية differential stain يمكن من خلالها التمييز كيمياويا بين نوعين من البكتريا التي لا يمكن تمييزها مظهرياً. وتساعد تفاعلات صبغة كرام في تصنيف البكتريا إلى مجموعتين رئيسيتين. تتميز المجموعة الأولى باحتفاظها بصبغة الكريستال البنفسجية crystal violet stain في أثناء عملية التحضير وتظهر بشكل أزرق إلى بنفسجي وتدعى بموجبة – الكرام positive . أما المجموعة الأخرى فتتميز بفقدانها لصبغة الكريستال البنفسجية بعد غمرها بالكحول

وتظهر بشكل أحمر وردي pink إلى أحمر عند صبغها بالسفرانين safranine وتدعى بسالبة – الكرام gram-negative. ويعود الاختلاف في التفاعل لصبغة الكرام جزئياً إلى الاختلافات الموجودة في تركيب ومكونات جدران الخلايا البكتيرية موجبة – الكرام وسالبة – الكرام. ويستلزم وجود أربع محاليل في صبغة الكرام:









شكل–٨٩: صبغ البكتريا بالطريقة السلبية

* الكريستال البنفسجي Crystal Violet (صبغة قاعدية).

* اليود Iodine والذي يعمل كمثبت للصبغة mordant، أي أنه يزيد من ألفة الخلايا لصبغة الكريستال البنفسجية.

* الكحول Alcohol (أو الإسيتون) والذي يعمل على إزالة الصبغة من الخلية (decolorization).

* السفرانين Safranine، صبغة قاعدية بلون مغاير وتستعمل كصبغة مضادة counterstain في الخلية في حالة إزالة صبغة الكريستال البنفسجية باستعمال محلول مزيل للون decolorizing solution.

١- حضّر مسح من بكتريا *E. coli* و *Bacillus subtilis* على شريحة زجاجية نظيفة كما في الشكل-٩٠. وتأكد من انفصال المسح عن بعضها.

٢- جفف بالهواء وثبت المسح بالحرارة.

٣- ضع الشريحة على مشبك سلكي wire mesh أو حامل ثم اصبغها بالكرستال البنفسجية لفترة ٣٠ ثانية من خلال وضع الصبغة على الشريحة (الشكل-٩٠). لا تترك الصبغة تجف على الشريحة، وفي الحالات الضرورية أضف صبغة إضافية.

٤- اسكب الصبغة الزائدة واغسل الشريحة بعناية بالماء الاعتيادي (الشكل-٩٠).

٥- أضف محلول اليود إلى الشريحة واتركه لفترة دقيقة واحدة (الشكل-٩٠).

٦- تخلص من محلول اليود باستعمال الماء الاعتيادي ثم جفف الشريحة باستعمال ورق النشاف (الشكل-٩٠).

٧- امسك الشريحة بشكل مائل ثم ضع قطرات من الكحول (٩٥٪) على السطح لحين اختفاء اللون البنفسجي من القطرات الساقطة لا تستمر في غسل الشريحة بالكحول عند توقف ظهور الصبغة في الكحول الساقط الشكل-٩٠.

٨- اغسل الشريحة بالماء الاعتيادي للتخلص من الكحول بسرعة ثم جفف الشريحة.

٩- اصبغ الشريحة بالصبغة المضادة (السفرانين) واتركها لفترة ٣٠ ثانية.

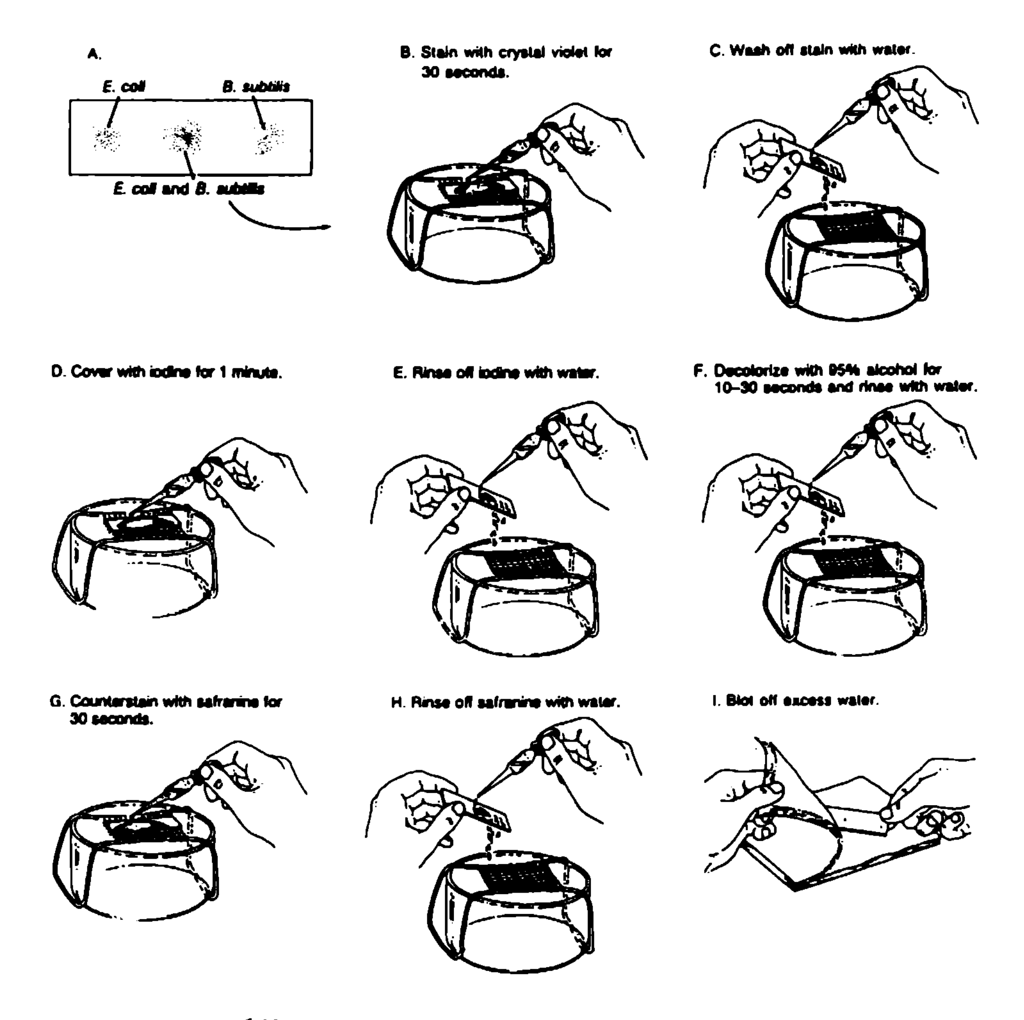
١٠- تخلص من الصبغة بعناية باستعمال الماء الاعتيادي. تخلص من الماء الزائد ثم جفف الشريحة بين ورقتي نشاف ثم جففها بالهواء.

١١- افحص المسحة الوسطية باستعمال الزيت oil immersion. وهذا سوف يساعدك في ملاحظة التباين بين البكتريا سالبة – الكرام والبكتريا موجبة – الكرام. ثم افحص المسحتين بالباقيتين. هل إن جرثومة *E. coli* سالبة – الكرام أو موجبة – الكرام؟ هل أن *B. Subtilis* سالبة الكرام أو موجبة الكرام؟.

١٢- افحص إذا كان ذلك ممكناً بقية أنواع البكتريا وحدد أي منها سالبة – الكرام وموجب الكرام.

٢- تنظيم نمو البكتريا Control of Bacterial Growth

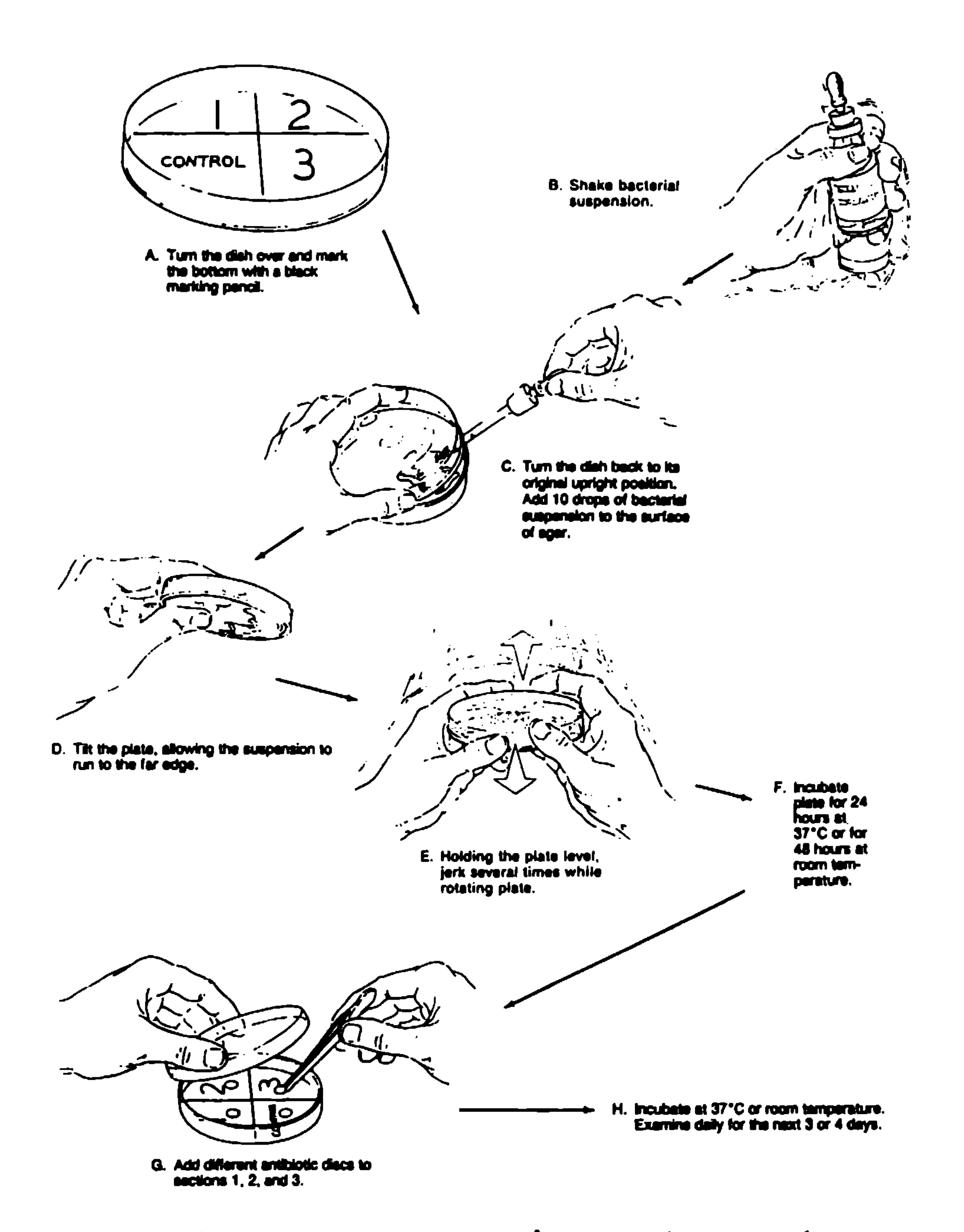
وجد عالم الأحياء البريطاني الكساندر فليمنك Alexander Fleming في عام ١٩٢٩ أن طبق بتري المحتوي على مزرعة البكتريا قد تلوث بفطر يدعى البنسيليوم *Penicillium*. وقد لاحظ الكساندر فليمنك حدوث تثبيط لنمو البكتريا الموجودة حول الفطر واعتقد بأن الفطر قد أنتج مادة كيمياوية لها القدرة على تثبيط نمو البكتريا. وقد عزل فليمنك هذه المادة الكيمياوية المضادة للبكتريا وسماها البنسيلين penicillin. وتدعى المواد الكيمياوية التي لها القابلية على إعاقة نمو البكتريا بالمضادات الحيوية antibiotics. ومن بين هذه المضادات الحيوية الستربتومايسين streptomycin والكلورومايستين chloromycetin والنيومايسين neomycin والنوفوبايوسين novobiocin والأيرثرومايسين erythromycin والكنامايسين kanamycin والبنسلين penicillin والتراسايكلين tetracycline . وقد أدى استعمال المضادات الحيوية إلى التقليل من تواجد وقابلية حدوث المرض virulence العديد من البكتريا.



الشكل-٩٠: مراحل صبغة كرام Gram stain للبكتريا.

سيقوم كل طالب في هذا الجزء من المختبر باختبار تأثير عدد من المضادات الحيوية على نمو أحد الأنواع من البكتريا الثلاث الشائعة.

١- حاول الحصول على طبق بتري يحتوي على الأكار الغذائي nutrient agar والذي هو عبارة عن مزيج من المواد الكيمياوية اللازمة لنمو البكتريا التي ستقوم بدراستها. اقسم الطبق إلى أربعة قطاعات sectors معلمة بالأرقام ١ و٢ و٣ وبالسيطرة control من خلال رسم خطوط في قاعدة الطبق باستعمال قلم الماجك الأسود (الشكل-٩١).



شكل – ٩١: طريقة تقدير تأثير المضادات الحيوية على نمو البكتريا.

٢- ارفع غطاء طبق بتري قليلاً وأضف عشرة قطرات من معلق البكتريا إلى الطبق (الشكل ٩١).

سيعطيك المدرس مزارع بكتيرية bacterial cultures لإحدى البكتريا الآتية:

Escherichia coli

Bacillus subtilis

Serratia marcescens

وقد يعطيك المدرس مزارع بكتيرية أخرى أو إضافية.

٣- حاول نشر معلق البكتريا إلى الحافات من خلال ميلان الطبق (الشكل-٩١). كرر هذه العملية عدة مرات مع تحريك الطبق إلى الأمام والخلف إلى أن يغطي معلق البكتريا سطح الأكار بكامله (الشكل-٩١).

٤- احضن الطبق لفترة ٢٤ ساعة بدرجة حرارة ٣٧°م أو لفترة ٤٨ ساعة بدرجة حرارة المختبر قبل إجراء الخطوة اللاحقة. لماذا يُحضن الطبق لفترة مناسبة من الوقت قبل إضافة المضاد الحيوي ؟.

٥- بعد انتهاء فترة الحضن ارفع الغطاء جزئياً، ومن خلال استعمال ملقط معقم ضع قرصاً يحتوي على مضاد حيوي مختلف في كل من القطاعات الأربعة للطبق (الشكل-٩١). وفيما يأتي أقراص المضادات الحيوية المتوفرة تجارياً والتي يمكن استعمالها في هذه الدراسة:

الكلورومايسيتين	النوفوبايوسين
الأيرثرومايسين	البنسلين
الكنامايسين	الستربتومايسين
النيومايسين	التتراسايكلين

ما هو الشي الذي يجب وضعه في قطاع السيطرة في طبق بتري؟.

٦- احضن الطبق بدرجة حرارة ٣٧° م أو بدرجة حرارة الغرفة كما مذكور سابقاً. افحص الطبق يومياً للأيام الثلاث أو الأربع القادمة. سجل ملاحظاتك في الجدول-٤٦ من خلال استعمال الرموز الآتية:

R (المقاومة resistant) يستعمل هذا الرمز في حالة عدم وجود منطقة تثبيط واضحة حول المستعمرة بحيث يتجاوز النمو القرص.

HS (عالي الحساسية highly sensitive) يستعمل هذا الرمز في حالة وجود منطقة متميزة من عدم النمو حول القرص مهما كان حجم هذه المنطقة.

S (حساس sensitive) يستعمل هذا الرمز في حالة وجود منطقة تثبيط مع ظهور نمو بعض المستعمرات في هذه المنطقة.

تحتوي بعض البكتريا على إنزيم يدعى بالبنسيلينيز penicillinase. هل إن نمو مثل هذه البكتريا يتثبط بالبنسلين؟ وضح ذلك.

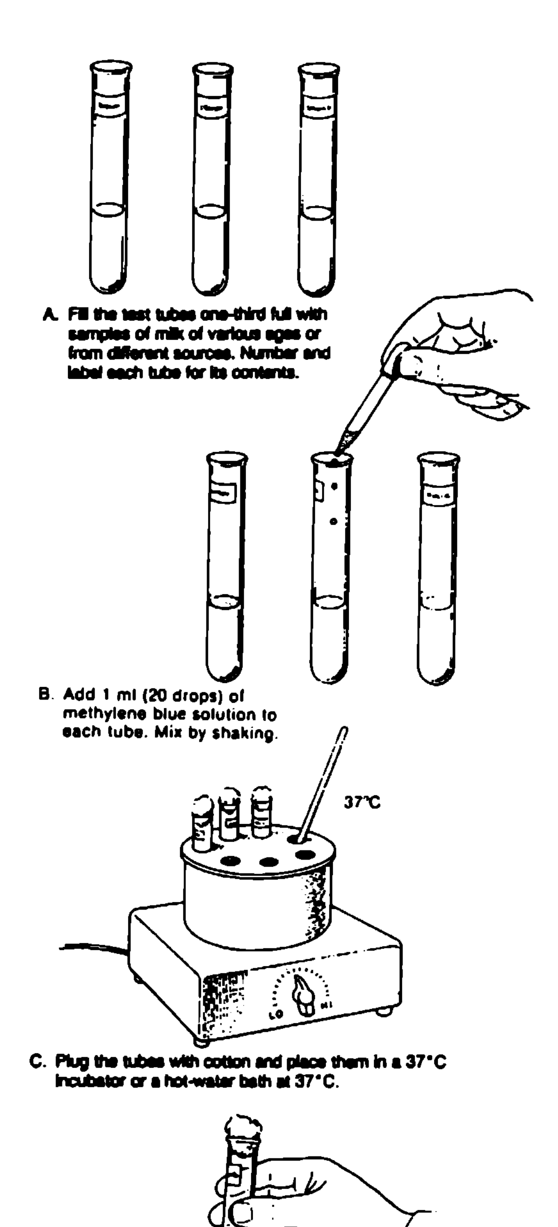
٣- البكتريا في الحليب Bacteria in Milk

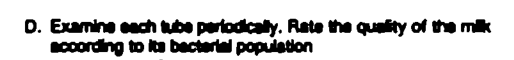
يعد الحليب من الأوساط الممتازة لنمو البكتريا لذا لا بد من اتخاذ الاحتياطات اللازمة عند التعامل معه. وإن البكتريا المؤذية في الحليب يمكن قتلها بعملية البسترة pasteurization، وتتضمن هذه العملية استعمال حرارة منخفضة لتقليل عدد البكتريا في الحليب وبقية الأغذية. وستقوم في هذه الدراسة بفحص الحليب المأخوذ من مصادر مختلفة وتحديد نوعيته على أساس نمو البكتريا.

١- حاول الحصول على ثلاث أو أربع عينات من الحليب من مصادر مختلفة:

(حليب طازج fresh من الحقل، حليب في صندوق غير مفتوح، حليب في قناني مخزونة في الثلاجة تم فتحها منذ ١-٣ أيام أو أكثر، حليب منتهي الصلاحية out - dated milk ، مسحوق حليب، حليب معلب canned milk، حليب بقر أو ماعز، أو أي حليب آخر تريد فحصه).

٢- خذ أنابيب اختبار واملأ كل واحدة منها إلى الثلث بالحليب المذكور. (الشكل-٩٢). علّم كل أنبوبة من هذه الأنابيب ثم أضف ١ مل (٢٠ قطرة) من محلول المثيلين الأزرق لكل أنبوبة. امزج محتويات كل أنبوبة بعملية الرج.





شكل – ٩٢ : طريقة تقدير تلوث الحليب بالبكتيريا

الجدول – ٤٦: حساسية البكتريا للمضادات الحيوية. استعمل الرموزR للمقاومة وHS للعالية الحساسية وS للحساسة

المضاد الحيوي	البكتريا			
	E. coli	*B. subtilis*	*S. marcescens*	بكتريا أخرى
الكلورومايسيتين				
الأيرثرومايسين				
الكنامايسين				
النيومايسين				
النوفوبايوسين				
البنسلين				
الستربتومايسين				
التتراسايكلين				

٣- ضع سداد قطني معقم في فوهة كل أنبوبة، ثم ضع الأنابيب في حاضنة أو حمام مائي بدرجة حرارة ٣٧°م (الشكل-٩٢). سجل الوقت في الجدول-٤٧.

عندما تنمو البكتريا في الحليب فإنها تستهلك الأوكسجين. ويمكنك الكشف عن نقص المحتوى الأوكسجين من خلال صبغة المثيلين الزرقاء، إذ إن هذه الصبغة تفقد لونها بانخفاض المحتوى الأوكسجين للحليب. فإذا كان عدد البكتريا في الحليب كبيراً فإن مزيج المثيلين الأزرق والحليب سيفقد اللون بسرعة. وتطول الفترة الزمنية اللازمة لإزالة لون المثيلين الأزرق في حالة انخفاض عدد البكتريا في الحليب. ويمكن في هذه التجربة تقييم نوعية الحليب من خلال عدد البكتريا الموجودة فيه ومن خلال الفترة الزمنية اللازمة لإزالة لون مزيج المثيلين الأزرق والحليب. ويجب ملاحظة عينات الحليب بشكل متكرر. بعدها يسجل الزمن اللازم لإزالة لون المثيلين الأزرق في كل عينة حليب. ويتم تقييم كل عينة استناداً إلى الجدول-٤٨.

الجدول – ٤٧: تقييم عينات الحليب المأخوذة من مصادر مختلفة

محتويات الأنبوبة	وقت إضافة المثيلين الأزرق	طول الفترة الزمنية اللازمة لإزالة لون المثيلين الأزرق	التقييم
١			
٢			
٣			
٤			

ما هو الشيء الذي يقلل من تلوث الحليب ؟.

ب- قسم البكتريا الزرقاء الخضراء Division Cyanobacteria

كانت هذه المجموعة من الكائنات الحية تدعى في السابق بالطحالب الزرقاء الخضراء. إذ تحتوي على أشكال وحيدة الخلية ومتعددة الخلايا. وتعد الأشكال الوحيدة الخلية أكثر بدائية. وبالرغم من أن البكتريا الزرقاء الخضراء هي كانت حية بدائية النواة بسبب فقدانها للنواة الحقيقية إلا أنها تستفيد من الماء في عملية التركيب الضوئي بوصفه عاملاً مختزلاً لثنائي أوكسيد الكاربون مما يؤدي إلى تكوين الأوكسجين كناتج عرضي. لذا تعد البكتريا الزرقاء الخضراء في هذا المجال مماثلة كيمياوياً للكائنات الحية حقيقية النواة والتي تقوم بعملية التركيب الضوئي مثل الطحالب algae والنباتات.

تحتوي البكتريا الزرقاء الخضراء على الكلوروفيل chlorophyll وصبغات أخرى تعرف بالفايكوبيلينات phycobilins: ودائماً ما توجد صبغة زرقاء تدعى بالفايكوسيانين phycocyanin، أما الفايكوايرثرين phycoerythrin (صبغة حمراء) فتوجد في حالات كثيرة.

ستتعرف في هذا المختبر على الشكل الخلوي ومدى التعقيد في البكتريا الزرقاء.

الجدول – ٤٨: الزمن اللازم لإزالة لون المثيلين الأزرق لعينات الحليب

الزمن اللازم لإزالة لون المثيلين الأزرق	التقييم
أقل من ٢٠ دقيقة	ملوث بشكل كبير
٢٠ دقيقة إلى ساعتين	رديء
٢ – ٥,٥ ساعة	متوسط
٥,٥ – ٨ ساعات	جيد
أكثر من ٨ ساعات	ممتاز

أي العينات أظهرت تلوثاً عالياً بالبكتريا ؟

أي العينات أظهرت أقل تلوث بالبكتريا ؟.

من النتائج التي تم الحصول عليها، ما هو الشيء الذي يؤدي إلى تلوث الحليب؟.

١- الأشكال وحيدة الخلية Unicellular Forms

حضر شرائح زجاجية رطبة لنوعين معروفين من البكتريا الزرقاء الخضراء هما الكروكوكاس *Chroococcus* والكليوكابسا *Gloeocapsa*. أضف قطرة من الحبر الصيني إلى الشريحة لغرض مشاهدة الغلاف الهلامي gelatinous sheath المحيط بالخلايا. وبالرغم من أن هذه الكائنات الحية هي أشكال وحيدة الخلية إلا أنها كثيراً ما تكوّن تجمعات من الخلايا. هل إن للخلايا المتجمعة غلاف هلامي مشترك ؟ هل تمثل هذه التجمعات كائنات حية متعددة الخلايا ؟ وضح ذلك.

٢- الأشكال متعددة الخلايا (المستعمرات)

Multicellular (colonies) Forms

تتحد أشكال مستعمرات البكتريا الزرقاء الخضراء بشكل كبير من خلال مستويات الانقسام الخلوي والتي قد تؤدي إلى تكوين خيوط filaments أو صفائح مسطحة سمكها خلية واحدة أو كرات من الخلايا.

افحص البكتريا الزرقاء الخضراء الآتية وصنفها استناداً إلى الشكل (مثلاً خيطي ...) وإلى مستوى الانقسام الخلوي (منفرد أو مزدوج أو غير منتظم) والذي يؤدي إلى تكوين شكل المستعمرة.

* المريسموبيديا *Merismopedia*

حدد موقع الغلاف الهلامي. وكثيراً ما تلاحظ خلايا المستعمرة في حالة انقسام.

* الأوسيلاتوريا *Oscillatoria*

ما هو الدليل الموجود على التمايز الخلوي cellular differentiation في هذه المستعمرة ؟.

هل يمكنك ملاحظة وجود أي حركة ؟.

كيف يتكاثر هذا الكائن الحي ؟.

* الريفيولاريا *Rivularia*

كيف يختلف شكل هذا الكائن الحي عن شكل الأوسيلاتوريا ؟.

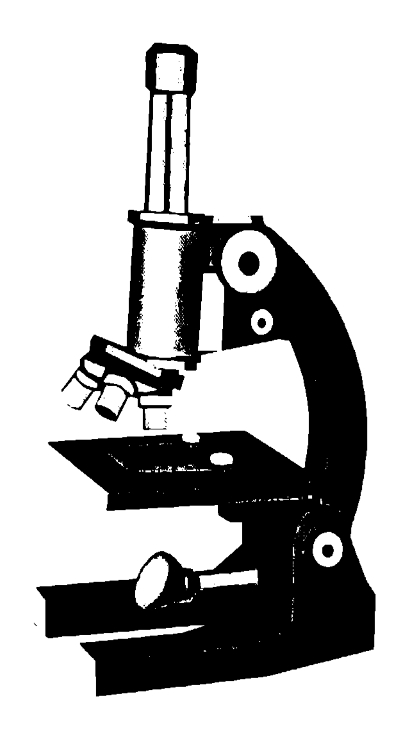
حدد موقع الكيس المختلف heterocyst الذي هو عبارة عن خلية كبيرة متثخنة الجدار. ما هي وظيفته ؟.

* الكلويوتريكيا *Gloeotrichia*

كيف يختلف هذا الكائن الحي عن الريفيولاريا ؟.

* الأنابينا *Anabaena*

اسحق خلايا السرخس المائي water fern المعروف باسم الأزولا *Azolla* لتحرير البكتريا الزرقاء الخضراء والتي تتواجد بشكل تكافلي (تعايشي) symbiotic داخل هذا النبات. ما هي الوظيفة التي يقوم بها الأنابينا داخل خلايا الأزولا ؟.



المختبر الخامس عشر

مملكة البروتستا (القسم الأول):

الطحالب والفطريات الغروية

Kingdom Protista I:

Algae and Slime Molds

إن البروتستا proteists هي كائنات حية حقيقة النواة تطورت من المونيرا Monera. وبالرغم من إنها تدعى في أحوال كثيرة بالبسيطة أو البدائية إلا أنها تتميز بدرجة من التخصص على المستوى الخلوي. وهذا مما جعلها تتكيف لمدى واسع من البيئات البايولوجية. وتشمل البروتستا عدداً من الكائنات الطفيلية مختلفة التغذية heterotrophs، والكائنات ذاتية التغذية autotrophs التي تقوم بعملية التركيب الضوئي (ضوئية ذاتية التغذية photoautotrophs)، والقليل من الأنواع التي تكون مختلفة التغذية وذاتية التغذية. وإن الكائنات الذاتية التغذية لها القابلية على تخليق جميع المواد العضوية اللازمة من المواد اللاعضوية البسيطة وضوء الشمس بعملية التركيب الضوئي. أما الكائنات المختلفة التغذية فتحصل في غذائها من المواد العضوية التي تكونها بقية الكائنات الحية. وتوجد هذه الكائنات الحية في المياه قليلة الملوحة brackish والعذبة fresh والبحرية marine، ولها علاقات تكافلية وتطفلية.

تتكون هذه المملكة من protista عدد من الأقسام divisions إلا أنه سيتم في هذا المختبر دراسة الطحالب والفطريات الغروية:

* قسم اليوغلينوفايتا Division Euglenophyta

إن معظم هذه المجموعة عبارة عن كائنات ذاتية التغذية شبيهة بالنباتات، وهناك عدد منها مختلف التغذية. ويخزن الغذاء بشكل باراميلون paramylon (سكر متعدد) ودهون.

* قسم الكرايسوفايتا Division Chrysophyta (الدياتومات diatoms والطحالب الصفراء – الخضراء والذهبية – البنية):

وهي عبارة عن طحالب وحيدة الخلية ذات بلاستيدات plastids محتوية على صبغات ذهبية صفراء أو صفرا خضراء. وإن معظمها أحادي الخلية والبعض منها خيطي. ويخزن الغذاء بشكل كاربوهيدرات تدعى الكرايسولامينارين chrysolaminarin.

* قسم الكلوروفايتا (الطحالب الخضراء) Division Chlorophyta:

وهي عبارة عن كائنات أحادية الخلية أو مستعمرات colonies أو متعددة الخلايا تحتوي على الكلوروفيل a وb وأشباه الكاروتين carotenoids . ويخزن الغذاء بشكل نشا. وإن الخلايا المتحركة تحتوي على أسواط.

* قسم الفيوفايتا (الطحالب البنية) Division Phaeophyta

وهي عبارة عن كائنات بحرية متعددة الخلايا تحتوي على الكلوروفيل a وc وصبغة الفيوكوزانثين fucoxanthin. ويخزن الغذاء بشكل كاربوهيدرات تدعى اللاميناريين laminarin. وإن للخلايا المتحركة سوطان أحدهما أمامي والآخر خلفي. وتُظهر الأشكال المتعددة الخلايا تمايزاً في تركيب جسم الكائن الحي. وإن للبعض منها خلايا توصيل متخصصة specialized conducting cells.

* قسم الرودوفايتا (الطحالب الحمراء) Division Rhodophyta

إن معظم هذه المجموعة عبارة عن كائنات بحرية تحتوي على الكلوروفيل a وd ونوعين من الفايكوبيلينات هما الفايكوايرثرين phycoerythrin والفايكوسيانين phycocyanin. ويخزن الغذاء بشكل كاربوهيدرات تدعى بالنشا الفلوريدي floridean starch. ولا توجد خلايا متحركة في دورة الحياة. وتكون خلايا التوصيل المتخصصة مفقودة.

* قسم الميكسومايكوتا (الفطريات الغروية الرغوية) Divisoin Myxomycota

وهي عبارة عن كائنات أميبية مختلفة التغذية يفقد معظمها لجدار الخلية إلا أنها تكوّن أكياس بوغية sporangia في بعض من مراحل دورات حياتها.

أ- الطحالب Algae:

هناك أكثر من ٢٠٠٠٠ نوع من الطحالب يصنف إلى عدة أقسام . وإن أفراد هذه الأقسام يعتمدون على عملية التركيب الضوئي مع وجود استثناءات قليلة.

وتتألف هذه الكائنات من خلايا منفردة أو خيوط من الخلايا أو صفائح plates من الخلايا. وإنها لا تمتلك التنظيم المعقد للأنسجة الموجود في النباتات الوعائية.

تختلف الطحالب فيما بينها في نوع الأسواط (في حالة تكوينها لخلايا متحركة motile cells) وفي العديد من الخصائص الكيمياوية الحياتية. ومع أن جميع الطحالب تحتوي على الكلوروفيل إلا أن مجاميع مختلفة تحتوي على العديد من أشباه الكاروتين. وإن أسماء أقسام الطحالب مشتقة من الصبغات المختلفة الموجودة فيها. كما أن هناك تغايرات كبيرة في نوع المواد الغذائية المخزونة في كل قسم من أقسام هذه الكائنات.

يكون التكاثر لا جنسياً، حيث يتم من خلال تجزئة جسم الكائن الحي أو من خلال تكوين الأبواغ (السبورات) spores التي تؤدي إلى تكوين أفراد جديدة. فضلاً عن ذلك قد يحدث التكاثر الجنسي لتكوين أفراد جديدة من خلال اتحاد مشيجين gametes. وإن البيضة المخصبة zygote المتكونة تتطور مباشرة لتكوين الطحلب أو أنها تقوم بتكوين الأبواغ.

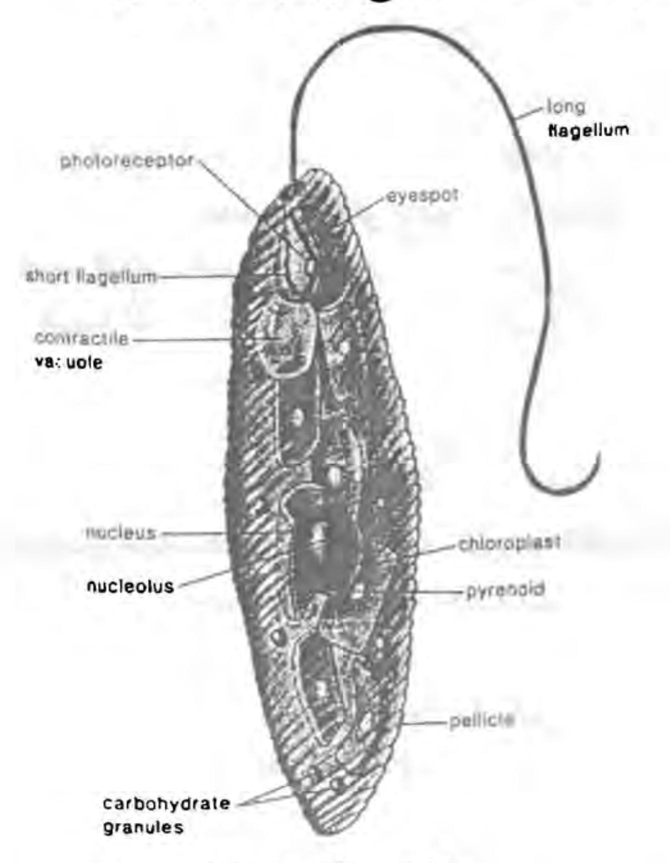
١- قسم اليوغلينوفايتا Euglenophyta:

لقد اكتسبت اليوغلينويدات في أثناء مراحل تطورها الطويلة البلاستيدات الخضراء chloroplasts ذات الخصائص الكيمياوية الحياتية المماثلة لتلك الموجودة في الطحالب الخضراء green algae. وإن اسم هذه المجموعة من الكائنات قد جاء من اسم أحد أفرادها المعروف باسم اليوغلينا *Euglena*. وإن اليوغلينا عبارة عن كائن ضوئي ذاتي التغذية أخضر اللون أحادي الخلية يتواجد في سطوح المياه الراكدة أو البطيئة الحركة.

ضع قطرة من مزرعة اليوغلينا الحية على شريحة زجاجية. أضف قطرة من المثيل سيلولوز methyl cellulose (١٠٪) والذي يعمل على إبطاء الحركات السريعة لليوغلينا. ضع غطاء الشريحة وافحص الشريحة تحت المجهر. لاحظ طريقة حركة الكائن الحي الفعال. إذ يتحرك بواسطة السوط flagellum الذي يعمل على سحب

الكائن الحي خلال الماء. هل إن حركة السوط تكون من قاعدته إلى قمته أم بالاتجاه المعاكس؟. كما وتُظهر اليوغلينا حركات شبيهه بالدودة worm like تحدث من خلالها سلسلة من التقلصات على طول الجسم. ونظراً لتميز اليوغلينا بهذه الحركة فقد سميت بالحركة اليوغلينية euglenoid movements .

حدد المظاهر الشكلية لليوغلينا باستعمال عدسة القوة الكبرى والاستعانة بالشكل-٩٣. ويمكنك استعمال شرائح لليوغلينا محضرة تجارياً.



شكل - ٩٣: اليوغلينا

لاحظ وجود غشاء مطاطي رقيق يدعى pellicle. وقد يكون هذا الغشاء مخططاً بسبب وجود تثخنات حلزونية. يدعى السايتوبلازم المحيطي الأكتوبلازم ectoplasm، أما السايتوبلازم الداخلي الأكثر كثافة فيدعى الأندوبلازم endoplasm. ويلاحظ

وجـود عضـيات صـغيرة محتويـة علـى الكلوروفيـل تـدعى البلاسـتيدات الخضـراء chloroplasts. وتكون النواة مركزية الموقع. ويمكن ملاحظة النوية nucleolus بسهولة في الشرائح الجاهزة بشكل جسم كثيف الصبغة. أمـا الفـم الخلـوي cytostome فهـو عبارة عن انخفاض قمعي الشكل قرب النهايـة الأماميـة للجسـم ويـؤدي إلى بلعـوم الخلية cytopharynx الذي يتوسع في قاعدتـه لتكـوين المسـتودع reservior. ويلاحـظ قـرب المسـتودع وجـود حويصـلة لطـرح المـاء water – expulsion vesicle (الفجـوة المتقلصة contractile vacuole) تعمل بشكل دوري على جمع الماء الزائـد وطرحـه إلى المستودع ثم إخراجه خلال بلعـوم الخليـة. ويوجـد مسـتقبل ضـوئي photoreceptor برتقالي محمر قرب النهاية الأمامية للحيـوان بجـوار بلعـوم الخليـة، ويكـون حساسـاً للضوء. ما هي الوظيفة التي يقوم بها هذا المستقبل الضوئي ؟.

بعد الانتهاء من الملاحظات حول اليوغلينا، أضف قطرة من محلول اليود قـرب حافة غطاء الشريحة حيث تتسرب هذه القطرة تحت الغطاء بواسطة الخاصية الشـعرية capillary action. ويعمل هذا اليود على صبغ السوط لكي تسهل رؤيته.

إن معظم كائنات اليوغلينا تكون ذاتية التغذية. وإن بعـض أنـواع اليوغلينـا لهـا القابلية على النمو والتكاثر دون وجود البلاستيدات الخضراء أو كلوروفيل، إذ أنهـا تكون مختلفة التغذية. وتتكاثر اليوغلينا بالانشطار الثنـائي binary fission. إذ تنقسـم النواة بواسـطة الانقسـام الاعتيـادي mitotic division، بعـدها تتضـاعف العضـيات الموجودة في النهاية الأمامية للحيوان مثل المستودع والسوط والمستقبل الضوئي.

يعقب ذلك حدوث انقسام طولي يبدأ بالنهاية الأمامية للجسم. ويمكنك فحص شرائح زجاجية حول هذا النوع من التكاثر في حالة توفرها.

٢- قسـم الـكريسـوفـايـتـا Chrysophyta:

يضم هذا القسم طائفتين class رئيستين هما: الداياتومات المحوية على ١٠٠٠٠ نوع، والطحالب الذهبية البنية المحتوي على حوالي ١٥٠٠ نوع، وطائفة صغيرة تضم حوالي ٦٠٠ نوع تدعى بالطحالب الصفراء الخضراء. وتتميز الكرايسوفايتات بوجود

البلاستيدات plastids التي تحتوي على صبغات ذهبية صفراء أو ذهبية خضراء، كما وتتميز بجدران خلوية صلبة العديد منها يكون مشرباً بالسيليكا؛ ويخزن الغذاء بشكل زيوت وكاربوهيدرات تدعى بالكرايسولامينارين chrysolaminarin . وإن المياه العذبة المحتوية على أعداد كبيرة من الكرايسوفايتات قد يكون طعمها زيتياً غير مرغوب فيه وكذلك الأسماك التي يتم اصطيادها في مثل هذه المياه.

توجد الدايوتومات في التربة والمياه العذبة والمالحة في العالم. وتعد الداياتومات من المكونات الرئيسة للهائمات plankton. وإن الهائمات عبارة عن كائنات حية بحرية صغيرة تعيش بأعداد كبيرة في المستويات العليا من المحيطات. كما وتعد الداياتومات من المصادر الغذائية المهمة للحيوانات البحرية.

ضع قطرة من مزرعة الداياتومات الحية على شريحة زجاجية، ثم ضع غطاء الشريحة وافحصها تحت المجهر. وفي حالة عدم وجود داياتومات حية افحص شريحة زجاجية جاهزة تحتوي على مزيج من الداياتومات المتنوعة. ومن الخصائص البارزة للداياتومات هي جدرانها الخلوية الجميلة المزخرفة والمكونة من البكتين pectin المشبع بالسيليكا. لاحظ العلامات markings الدقيقة على جدار الخلية والتي تعطي لكل داياتوم مظهره الشكلي الذي يميزه عن بقية أنواع الداياتومات. وإن هذه العلامات عبارة عن ثقوب تربط البروتوبلازم الحي الموجود ضمن القشرة بالمحيط الخارجي. وتتألف جدران الداياتومات من جزئين متراكبين يدعى كل منهما بالمصراع valve، ويتراكب كل مصراع مع الآخر بشكل يشبه تراكب قمة وقعر طبق بتري. وإن المصراعين قد يكونان ريشي الشكل pennate أو مركزي centric. وإن الداياتومات الريشية الشكل pennate diatoms هي عبارة عن كائنات زورقية أو قضيبية الشكل. ويكون نمط التناظر للعلامات فيها ذو جانبين bilateral. ويوجد أخدود في مركز كل مصراع لمعظم الدايوتومات الريشية الشكل. أما الداياتومات المركزية فتكون دائرية أو بيضوية أو إهليليجية ولها تناظر شعاعي radial symmetry افحص الشريحة وحدّد الداياتومات الريشية الشكل والمركزية.

توجد الأرض الداياتومية diatomaceous earth (الداياتومايت diatomite)

بشكل ترسبات من القشور السيليكونية للداياتومات التي ترسبت في قعر المحيطات الأولى على مدى ملايين السنين. وقد استعملت كمادة كاشطة abrasive material في صقل أو تلميع الفضة silver polish وفي فرش الأسنان وفي المواد المرشحة والعازلة.

٣- قسم الكلوروفايتا Chlorophyta:

تُظهر الطحالب الخضراء من بين البروتستا تغايرات كبيرة في الشكل وأنماط التكاثر. ويوجد ما يقارب من ٩٠٠٠ نوع من الطحالب الخضراء. ويكون معظمها مائياً، أما الباقي فيعيش في مواقع متنوعة تشمل السطوح الثلجية والينابيع الحارة وجذوع الأشجار، وتعيش بشكل تكافلي مع الأشنات lichens والابتدائيات protozoa والهايدرا hydra.

أ- خط الفولفوكس في تطور الطحالب الخضراء:

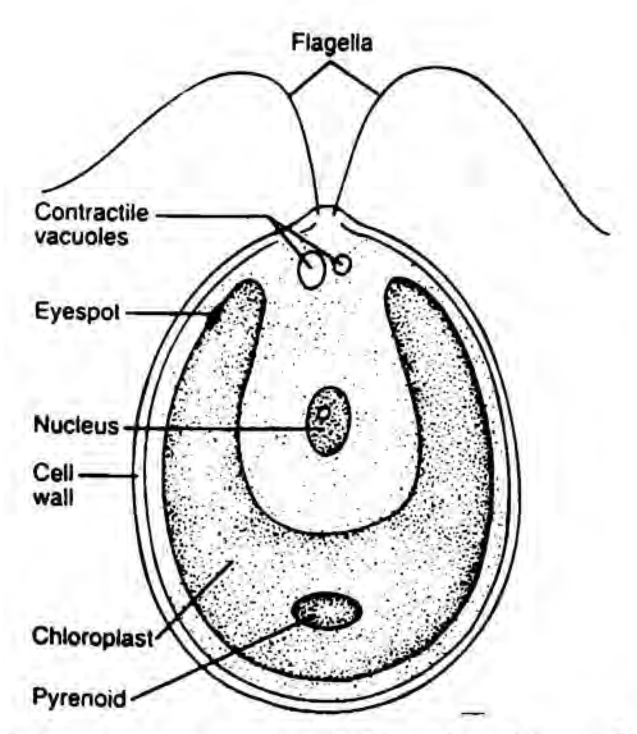
هناك اتجاهين تطوريين بين أعضاء قسم الطحالب الخضراء:

تتراوح درجة التعقيد في ثالوس thallus (تركيب الجسم) أفراد المجموعة من الخلية المنفردة إلى المستعمرة المتعددة الخلايا. وتعد الأشكال الأحادية الخلية أكثر الأشكال بدائية. أما الأشكال (الموجودة بشكل مستعمرات) فإنها ربما نشأت بشكل طحلب أحادي الخلية اكتسب التعقيد من خلال الانقسامات الخلوية في مختلف المستويات.

يحدث التكاثر الجنسي بأنواع من الأمشاج gametes . ففي حالة isogamy يحدث التكاثر الجنسي من خلال اتحاد أمشاج متماثلة من الناحية المظهرية. أما في حالة oogamy فيحدث التكاثر الجنسي من خلال اتحاد أمشاج مختلفة، حيث يكون أحدها كبيراً وغير متحركاً ، ويعد هذا النوع من التكاثر أكثر تقدماً.

سيقوم كل طالب في هذا المختبر بفحص الكلاميدوموناس *Chlamydomonas*

الذي يعد من الأشكال البدائية؛ والكونيوم *Gonium* والباندورينا *Pandorina* التي تمثل الأشكال المعقدة المتدرجة، والفولفوكس *Volvox* الذي يمثل قمة التعقيد التطوري. لاحظ الاختلافات الموجودة بين هذه الكائنات الحية عند فحصها.

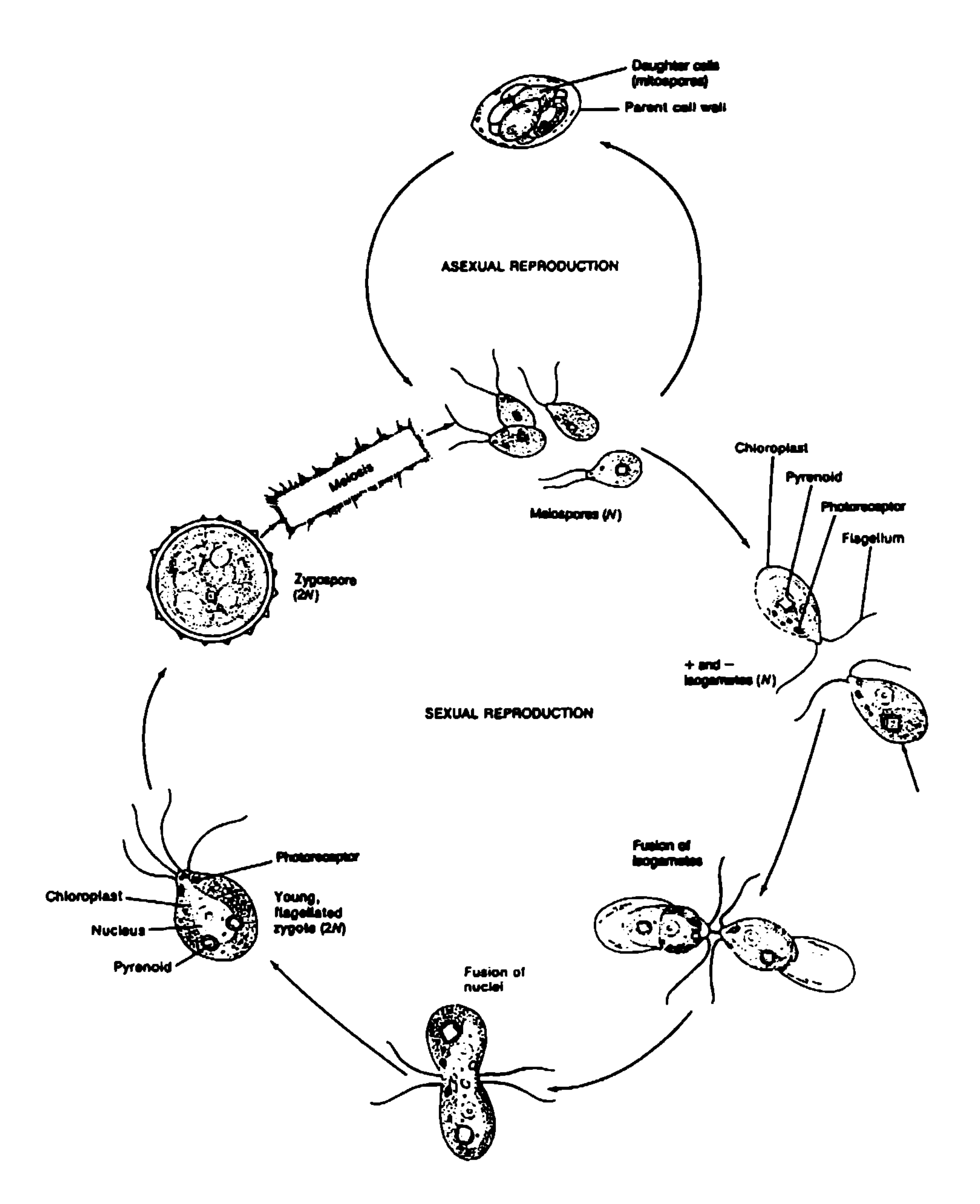


شكل – ٩٤ : تركيب الكلاميدوموناس *Chlamydomonas*

الكلاميدوموناس Chlamydomonas:

وهو عبارة عن طحلب متحرك أحادي الخلية يوجد في التربة الرطبة والبحيرات وقنوات الري . وإن شكله يشبه البيضة ويحتوي على بلاستيدات خضراء chloroplast كبير كأسي الشكل يحتوي على جسم بروتيني يدعى البايرينويد pyrenoid يعمل في تكوين النشا. ويوجد مستقبل ضوئي photoreceptor في داخل البلاستيدات الخضراء. ويصعب رؤية النواة في الخلية الحية.

حضّر شريحة زجاجية لكلاميدوموناس حي وافحصه تحت المجهر (الشكل-٩٤). أضف قطرة من المثيل سيلولوز لإبطاء حركة الطحلب. حدد مواقع البلاستيدات الخضراء والبايرينويد. ويلاحظ وجود سوط في النهاية الأمامية للخلية يساعد في حركة الطحلب داخل الماء. ويمكن ملاحظة السوط بسهولة من خلال تقليل إضاءة المجهر بواسطة إغلاق الحجاب القزحي iris diaphragm.



شكل – ٩٥ : دورة حياة طحالب الكلاميدوموناس *Chlamydomonas* وهي طحالب خضراء أحادية الخلية.

يـنكمش السـوط وتتوقـف الحركـة في بدايـة التكـاثر اللاجنسـي asexual reproduction. ويحدث الانقسام الاعتيادي في أثناء فترة السكون هذه والـذي يـؤدي

إلى تكوين بروتوبلاستات daughter protoplasts والتي يمكن أن تنقسم مرة ثانية وثالثة (الشكل-٩٥). بعد ذلك يتكون جدار خلوي حول كل بروتوبلاست وليدة مما يؤدي إلى تكوين مستعمرات مؤقتة تتحطم بعدها محررة خلايا وليدة تدعى بأبواغ الانقسام mitospores. حدد مواقع المستعمرات الخضرية غير المتحركة في الشريحة الخاصة بك والتي تُظهر وجود خليتين وليدتين أو أربعة أو ثمانية خلايا وليدة.

تكوّن معظم الطحالب الخضراء في التكاثر الجنسي أمشاج أحادية المجموعة الكروموسومية haploid gametes. وفي الكلاميدوموناس فإن خليتين خضريتين vegetative cells يمكن أن تعملان كمشيجين أحدهما يمثل المشيج الذكري والآخر يمثل المشيج الأنثوي. وتكون هذه الأمشاج في العادة متماثلة الحجم والمظهر، ومع ذلك ففي بعض الأنواع قد يكون المشيج الأنثوي أكبر قليلاً من المشيج الذكري. وتدعى الأمشاج المتماثلة مظهرياً بالأمشاج المتساوية isogametes.

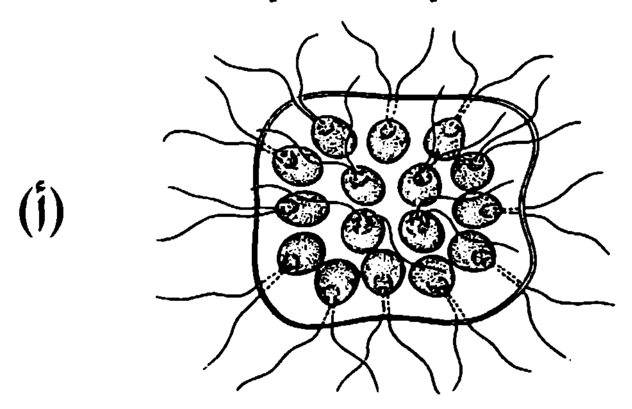
يمكن توضيح التكاثر الجنسي في الكلاميدوموناس باستعمال ضروب تزاوجية mating strains يطلق على أحدها بالموجب (+) plus والآخر بالسالب (-) minus . ضع قطرة من كل نوع على شريحة زجاجية بحيث تكون كل قطرة منفصلة عن الأخرى. وفي الوقت الذي تلاحظ فيه القطرتين تحت المجهر تسبق عملية اتحاد الأمشاج. حدد مواقع الخلايا المقترنة باستعمال المجهر المركب. في أي نهاية من الخلية حدث الاتحاد ؟.

نتيجة لاتحاد الأمشاج تتكون بيضة مخصبة zygote محتوية على العدد الزوجي من الكروموسومات، وتقوم هذه البيضة المخصبة بإفراز جدار شوكي سميك لتكوين zygospore والذي يدخل في فترة سكون dormancy . افحص المستحضر ولاحظ الأبواغ zygospore. وعند توفر الظروف الملائمة تمر نواة البيضة المخصبة بالانقسام الاختزالي (الانقسام المنصّف) لتكوين أربع نوى تحتوي كل واحدة منها على العدد الأحادي من الكروموسومات (N). بعدها ينقسم السايتوبلازم مكوناً أبواغ أحادية النواة تتحرر من البوغ zygospore حيث تتكون فيها الأسواط وتسبح في الماء.

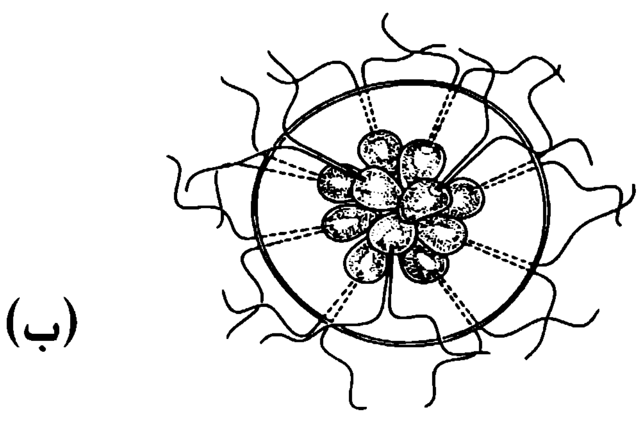
الكونيوم *Conium*:

وهو عبارة عن كائن حي يعيش بشكل مستعمرات مكونة من خلايا شبيهه بالكلاميدوموناس تترتب بشكل مستعمرة مسطحة (الشكل- ٩٦). وتتماسك الخلايا مع بعضها بواسطة مادة هلامية. ويمثل الكونيوم مرحلة في التطور يصبح فيها جسم النبات أكبر من خلال تجمع عدد قليل من الخلايا التي تُظهر تنسيقاً بسيطاً. وتسبح خلايا هذه المستعمرة بشكل منسجم بحيث تتحرك صفيحة الخلايا بوصفها وحدة واحدة. افحص المستعمرات الحية للكونيوم. هل إن عدد الخلايا في كل مستعمرة يكون ثابتاً؟ وإذا لم يكن كذلك اذكر التغاير الموجود في عدد الخلايا في المستعمرات المختلفة.

(أ)



(ب)



شكل – ٩٦: طحالب خضراء بشكل مستعمرات

(أ) طحالب *Gonium* (ب) طحالب *Pandorina*

الباندورينا *Pandorina*:

افحص المستعمرات الحية للباندورينا *Pandorina*، إذ تتكون المستعمرة من خلايا شبيهة بالكلاميدوموناس (الشكل-٩٦). كيف يختلف شكل مستعمرة الباندورينا عن مستعمرة الكونيوم؟ وكيف يختلف عدد الخلايا بين المستعمرتين ؟.

إن كل خلية في مستعمرة الباندرينا والكونيوم عندما تنضج تكوّن لاجنسياً مستعمرة جديدة تقع ضمن الغلاف الهلامي للمستعمرة الأصلية. وفي حالة التكاثر الجنسي لهذه الطحالب تتحد الأمشاج المتساوية isogametes لتكوين البيضة المخصبة التي تمر بعملية انقسام اختزالي لتكوين أبواغ الانقسام الاختزالي meiospores. وإن لكل بوغ القابلية على تكوين مستعمرة جديدة.

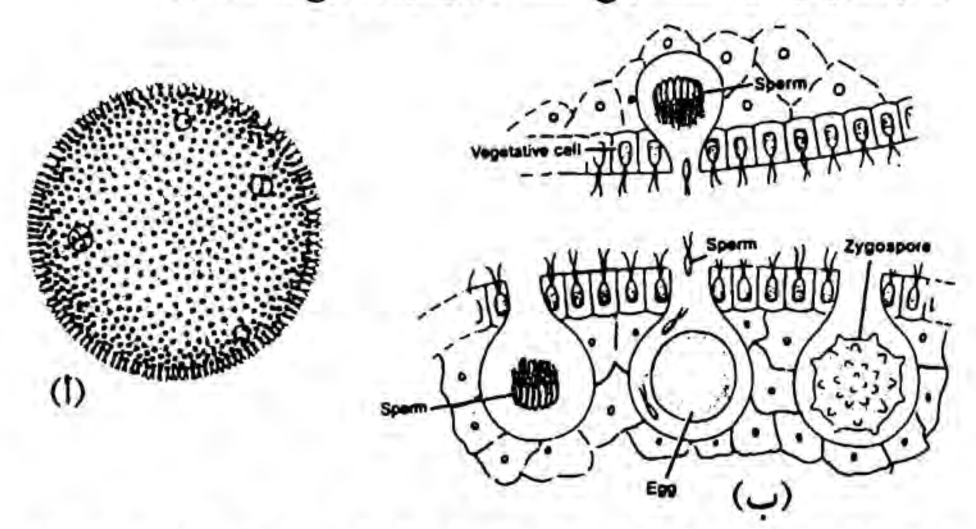
الفولفوكس *Volvox*:

وهو عبارة عن طحلب أخضر بشكل مستعمرات يكون في الثالوس thallus عبارة عن مستعمرة كروية مجوفة مكونة من ٥٠٠ - ٥٠٠٠٠ خلية مرتبطة مع بعضها بواسطة ماتركس (الشكل-٩٧). وإن للخلايا المنفردة العديد من الخصائص الملاحظة في الكلاميدوموناس. إذ أنها تحتوي على مستقبل ضوئي وأسواط وبلاستيدات خضراء كبيرة. وهناك خلايا متخصصة في الفولفوكس تعمل في التكاثر. ويتم التكاثر اللاجنسي من خلال تضخم خلايا خاصة في المستعمرة ثم انقسامها. وتكوّن هذه الخلايا في المرحلة المبكرة من التطور صفيحة مسطحة تتكور بشكل كرة ذات فتحة صغيرة في نهايتها الخلفية. ويزداد حجم المستعمرة الجديدة وتنقلب الكرة خلال الفتحة ويصبح الداخل إلى الخارج لتكوين مستعمرة وليدة، تتحرر عند انحلال المستعمرة الأصلية.

افحص عينة من الفولفوكس الحي باستعمال المجهر التشريحي. أعطِ وصفاً لحركة الفولفوكس. أعطِ وصفاً لشكل المستعمرة.

افحص المادة الحية والشرائح الجاهزة للفولفوكس لملاحظة المستعمرات الوليدة.

إن جميع الطحالب الخضراء المدروسة تكوّن أمشاج isogametes. أما الفولفوكس فإنه يكوّن أمشاج تتمايز مظهرياً إلى نطف وبيوض وتدعى هذه الأمشاج oogametes (الشكل-٩٧). وتنشأ هذه الأمشاج من خلايا تتمايز عند نمو المستعمرة. فعند تكوين البيضة، يزداد حجم إحدى الخلايا المتمايزة بشكل كبير حيث تتخذ شكلاً دائرياً وتمتلئ بالمواد الغذائية لا سيما الدهون. أما الأمشاج الذكرية فإنها تتكون من بقية الخلايا والتي تكوّن حزماً مسطحة من النطف المسوطة. وعندما تنضج البيضة فإنها تتخصب بالنطفة وتكوّن جداراً شوكياً سميكاً مكونة zygospores. ويحدث إنبات zygospores في الربيع مكوناً مستعمرة جديدة. افحص الشرائح الجاهزة للفولفوكس وحدد مواقع النطفة والبيوض والأبواغ zygospores.



شكل – ٩٧: طحالب الفولفوكس *Volvox* وهي طحالب خضراء بشكل مستعمرات

(أ) مستعمرات الفولفوكس. (ب) التكاثر الجنسي.

ب- الطحالب الخضراء الخيطية Filamentous Green Algae:

السبايروجيرا *Spirogyra*:

وهو عبارة عن طحلب أخضر طافي يوجد في برك المياه العذبة الصغيرة في فصل الربيع (الشكل-٩٨).

حضّر عينة طرية من السبايروجيرا وافحصها تحت المجهر. هل تلاحظ وجود تفرعات ؟ من أين جاءت تسمية السبايروجيرا ؟.

حدد مواقع البايرينويدات pyrenoids الصغيرة الموجودة في البلاستيدات الخضراء. وتكون النواة معلقة في مركز الخلية بواسطة هيكل الخلية cytoskeleton، علماً بأنه يصعب رؤيتها في التحضيرات غير المصبوغة.

ضع قطرة من صبغة المثيلين الأزرق قرب حافة غطاء الشريحة. وبعد بضع دقائق افحص الخلية مرة أخرى وحدد موقع النواة والتي تظهر بشكل جسم مزرق في الجزء المركزي من الخلية.

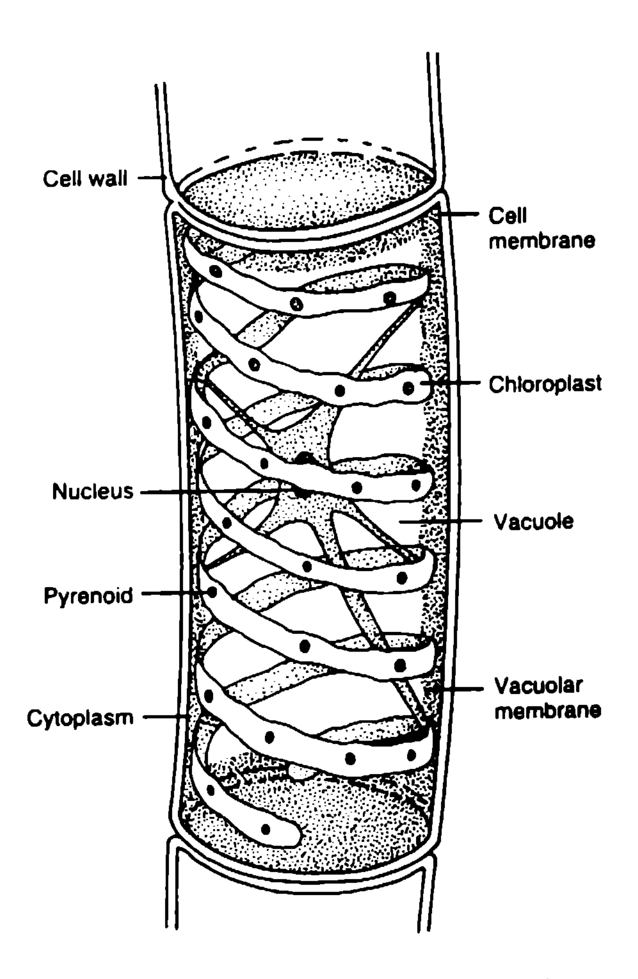
تقترب خيوط السبايروجيرا من بعضها في أثناء التكاثر الجنسي، بعدها تظهر بروزات صغيرة في الخلايا المتقابلة لكل خيط (الشكل-٩٩). ويزداد طول هذه البروزات حيث تلتقي مع بعضها، وعند منطقة الاتصال يتحلل جدار الخلية ويتكون أنبوب الاقتران conjugation tube ويصبح سايتوبلازم الخلايا المقترنة بشكل أمشاج متساوية isogametes ويعمل أحد المشيجين كذكر male حيث ينتقل خلال أنبوب الاقتران ليتحد مع المشيج الأنثوي غير المتحرك. ويؤدي اتحاد الأمشاج إلى تكوين zygospores والتي تتحرر عند انحلال الخيط.

وتمر نواة zygospores بعملية انقسام اختزالي قبل حدوث الإنبات germination وإن ثلاث نوى من النوى الأربعة أحادية المجموعة الكروموسومية المتكونة ستتحلل. وعند إنبات zygospores يتكون بروز صغير يحتوي على النواة الرابعة.

وتؤدي الانقسامات الاعتيادية إلى تكوين خيط من الخلايا المماثلة للخيط الأصلي.

افحص السبايروجيرا الحية لملاحظة المراحل المختلفة من عملية اتحاد الأمشاج.

وفي حالة عدم وجود مراحل الاقتران أو تكوين zygospores في العينة التي حضرتها، يمكنك فحص شرائح جاهزة توضح لك هذه العملية.

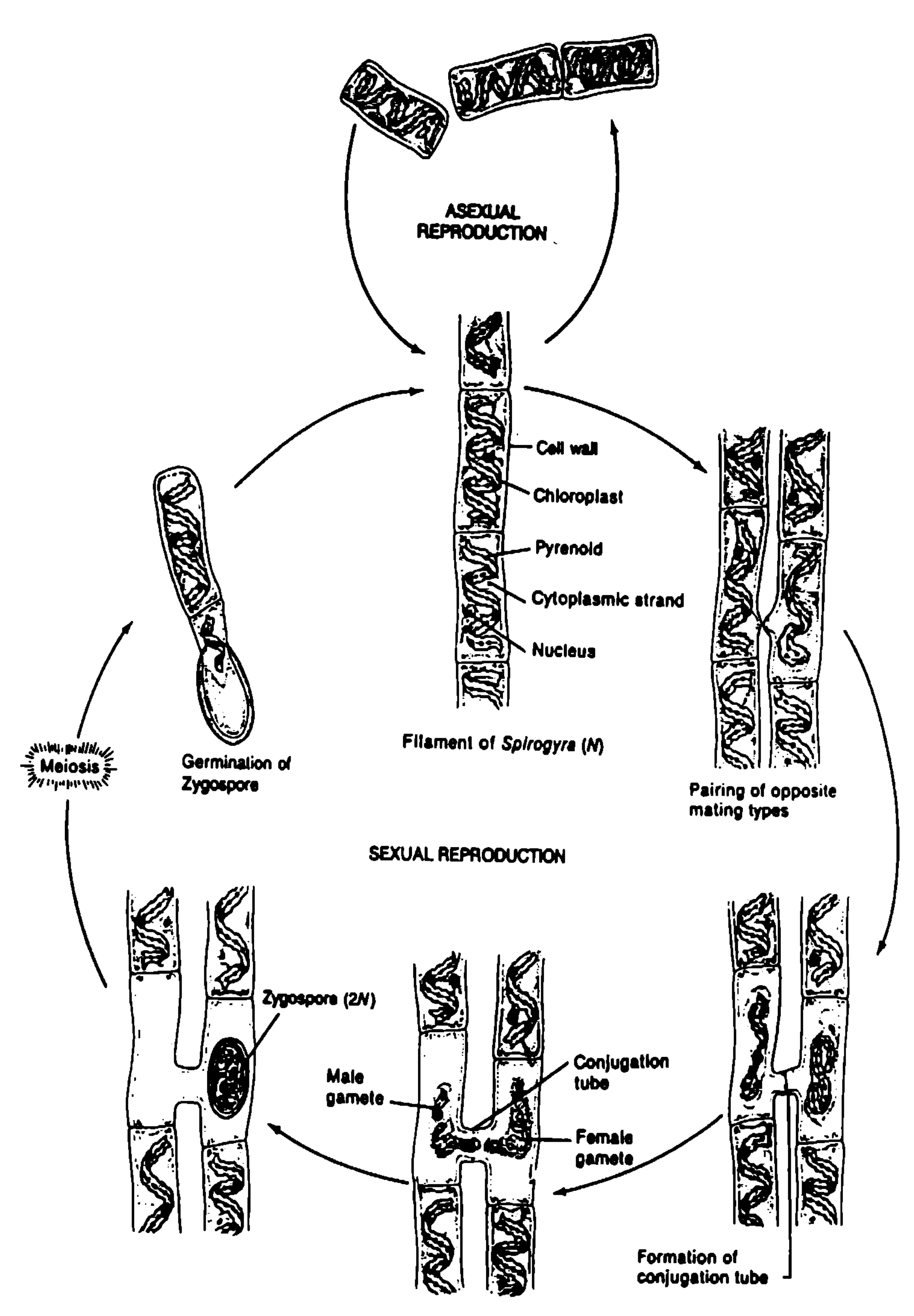


شكل – ٩٨: تركيب السبايروجيرا *Spirogyra*

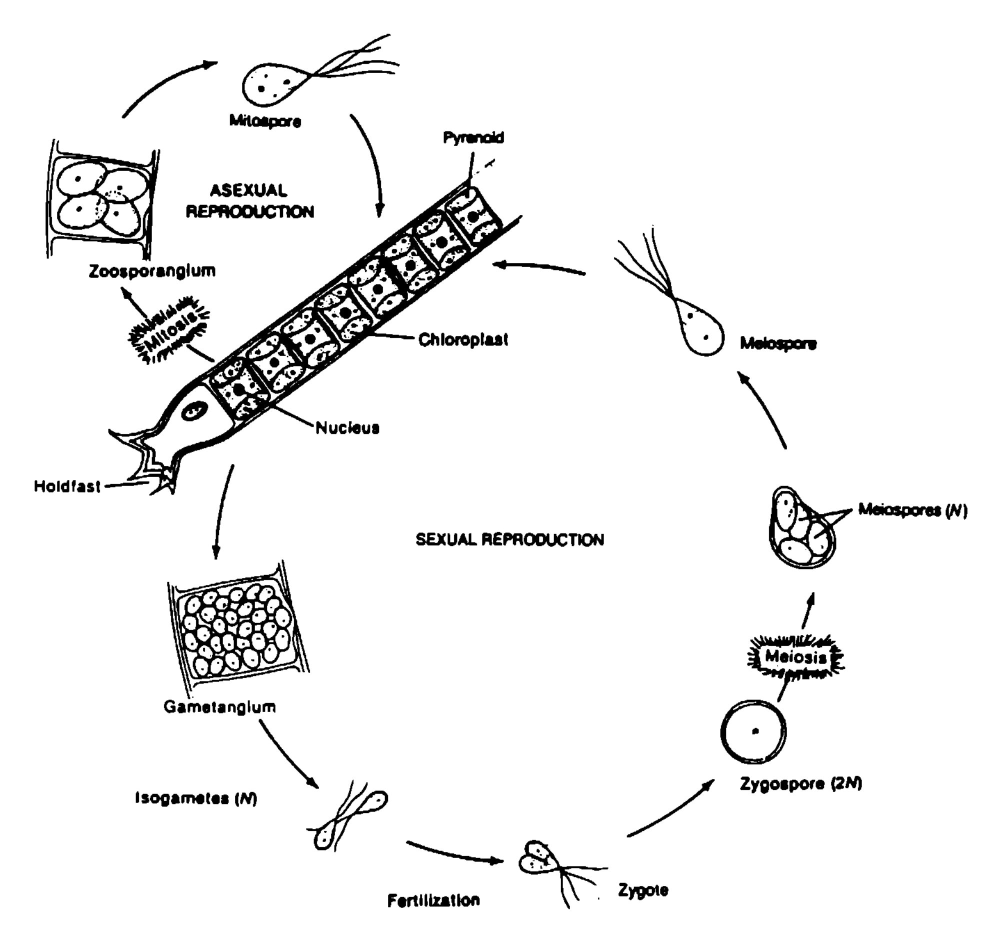
لا توجد وسائل للتكاثر اللاجنسي في السبايروجيرا باستثناء تجزئة الخيوط (fragmentation) أو تقطعها.

اليولوثركس *Ulothrix*:

إن اليولوثركس يشبه السبايروجيرا. إذ يتألف من خيط من الخلايا البسيطة غير المتفرعة. وإنه لا يشبه السبايروجيرا من حيث كونه غير طاف في الماء، بل إنه يحتوي على خلية تثبيت قاعدية holdfast cell تعمل على ارتباطه بالصخور وبقية الأجسام الموجودة في المياه العذبة وفي بعض الأنواع في المياه المالحة (الشكل–١٠٠).



شكل – ٩٩: دورة حياة السبايروجيرا *Spirogyra* وهي من الطحالب الخضراء الخيطية.



شكل – ١٠٠: دورة حياة *Ulothrix*

افحص الشريحة الجاهزة أو العينة الحية من اليولوثركس. ولاحظ تشابه جميع الخلايا باستثناء المثبت holdfast. وإن هذه الخلية المثبتة قد لا تكون موجودة في العينة الخاصة بك. لماذا؟.

تكون البلاستيدات الخضراء شبيهة بحرف C باللغة الإنكليزية، وقد يحتوي على بايرينويد واحد أو أكثر. هل يوجد مستقبل ضوئي؟.

وإذا كان لا يوجد فلماذا تتوقع أن يحتوي مثل هذا الكائن الحي على هذا التركيب؟. يمكن لأي خلية باستثناء خلية التثبيت أن تتكاثر بواسطة الوسائل اللاجنسية أو الجنسية. ففي حالة التكاثر اللاجنسي يمر السايتوبلازم الخلية الأصلية

(الخلية الأم) parent cell بعملية انقسام اعتيادي مكوناً ٤-٨ خلايا وليدة والتي عندما تتحرر من الخلية الأصلية (حاملة الأبواغ الحيوانية zoosporangium) تصبح بشكل أبواغ الانقسام الاعتيادي mitospores (الشكل-١٠٠). وتسبح هذه الأبواغ لفترة قصيرة من الوقت، تفقد بعدها الأسواط وتستقر في القعر وتكوّن بعدها خيوطاً جديدة من خلال سلسلة من الانقسامات الاعتيادية. أما في حالة التكاثر الجنسي فإن الخلية الأصلية تكوّن ٣٢ – ٦٤ مشيجاً متساوياً isogametes مكونة ما يسمى بخلية الأمشاج gametangium. وتكون الأمشاج المتساوية أصغر حجماً من الأبواغ الانقسامية وتحتوي على سوطين بدلاً من أربعة أسواط الموجودة في أبواغ الانقسام. وتتحد أمشاج الخيوط المختلفة لتكوين البيضة المخصبة zygote التي تدخل في فترة سبات dormant period وتدعى في هذه الفترة zygospore. وعند توفر الظروف الملائمة يمر zygospores بعملية انقسام اختزالي مكوناً أربعة أبواغ أحادية المجموعة الكروموسومية haploid meiospore، ويكوّن كل بوغ خيطاً جديداً من الخلايا.

هل إن الجسم النباتي في اليولوثركس أحادي المجموعة الكروموسومية haploid أم ثنائي المجموعة الكروموسومية diploid ؟ وضح ذلك. أي نوع من التكاثر (الجنسي أم اللاجنسي) هو المسؤول بشكل رئيس عن زيادة عدد اليولوثركس ؟ وضح ذلك.

تحت أي ظروف بيئية تتوقع أن يحدث التكاثر الجنسي ولماذا ؟.

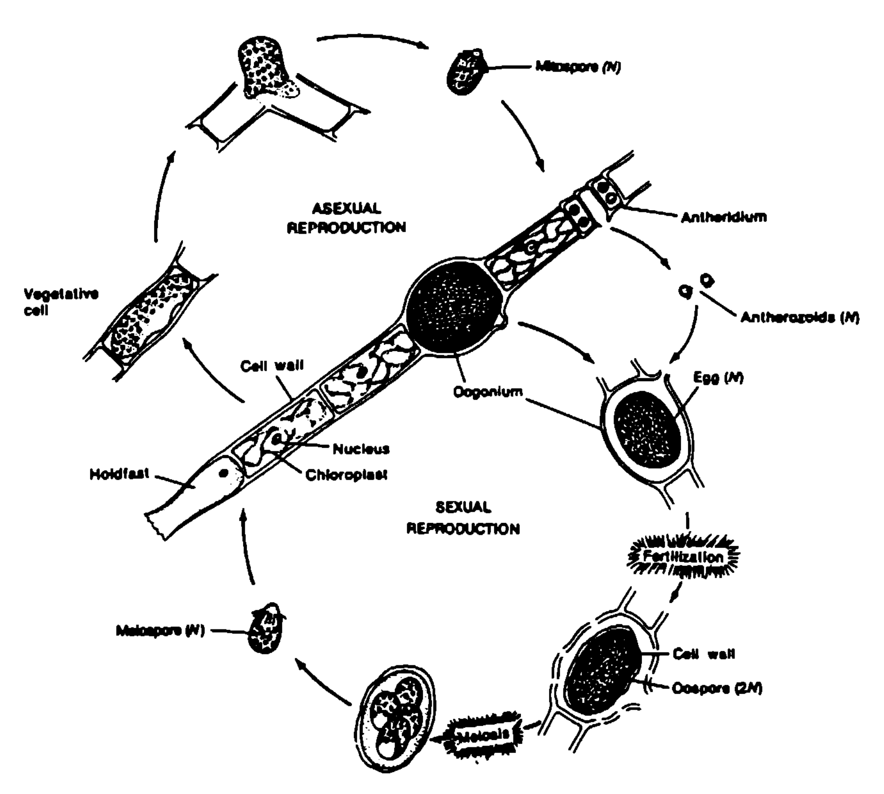
الايدوكونيوم *Oedogonium*:

إن الأيدوكونيوم عبارة عن جسم نباتي بسيط غير متفرع مكون من سلسلة من الخلايا وهو بذلك يشبه السبايروجيرا واليولوثركس. ويختلف الأيدوكونيوم عن اليولوثركس في وجود بعض الخلايا التي تتخصص إلى تراكيب تكاثرية مكونة أمشاج ذكرية وأنثوية متميزة (الشكل-١٠١). وتحتوي بعض أنواع الأيدوكونيوم على خلايا تثبيت holdfast cells. افحص عينات حية أو شرائح جاهزة للأيدوكونيوم. كيف يختلف شكل البلاستيدات الخضراء في الأيدوكونيوم عن ذلك الموجود في السبايروجيرا واليولوثكس ؟. أين توجد البايرينويدات ؟.

اذكر الاختلافات الموجودة في أشكال الخلايا المكونة لثالوس الأيدوكونيوم.
يحدث التكاثر اللاجنسي بطريقتين. إذ يمكن للجسم النبات أن يتجزأ إلى قطع fragments بحيث يزداد حجم كل قطعة من خلال الانقسام الخلوي، أو أن سايتوبلازم أي خلية خضرية vegetative cell (الخلية اللاتكاثرية أو خلية التثبيت) يمكن أن تصبح بشكل بوغ انقسام mitospore والذي عندما يتحرر يسبح بشكل فعال لفترة من الوقت، يكوّن بعدها خيطاً من الخلايا (الشكل-١٠١).

لدراسة الطور الجنسي افحص شريحة جاهزة أو عينة حية تظهر منها الأنثريديا antheridia (التراكيب الذكرية) والأووكونيا oogonia (التراكيب الأنثوية) والتي هي عبارة عن خلايا تناسلية متخصصة. وإن الأنثريديا هي عبارة عن خلايا قصيرة قرصية الشكل على العكس من الخلايا الخضرية المتطاولة للخيط النباتي. وإن كل أنثريديوم antheridium يعطي مشيجين ذكريين يدعى كل واحد منهما بالأنثروزويد antherozoid (النطفة sperm). وإن هذه الأنثروزويدات هي عبارة عن خلايا صغيرة بيضوية الشكل تحتوي في نهاياتها المدببة على حلقة من الأسواط. أما الأووكونيوم oogonium فهي عبارة عن خلية كبيرة كروية الشكل يكوّن فيها السايتوبلازم مشيج واحد يدعى بالبيضة egg.

وحالما تنضج البيضة يظهر في جدار الأووكونيوم ثقب صغير أو تكسر مستعرض. وإن الأنثروزويدات السابحة قرب الأووكونيوم تنجذب نحو البيضة حيث تدخل الأووكونيوم من خلال الثقب أو منطقة التكسر crack. وتؤدي عملية الإخصاب fertilization إلى تكوين البيضة المخصبة التي تبقى في الأووكونيوم. بعدها تكوّن البيضة المخصبة جدار سميك وتدخل في السبات. وتدعى في هذه المرحلة ببوغ البيضة oospore. ويؤدي انحلال جدار الأووكونيوم إلى تحرر بوغ البيضة والذي يبقى سابتاً لعدة أشهر. وعندما تكون الظروف البيئية ملائمة للنمو ينقسم بوغ البيضة انقساماً اختزالياً مكوناً أربعة أبواغ أحادية المجموعة الكروموسومية، وينمو كل بوغ لتكوين نبات خيطي جديد. ما هو الشيء الذي يجعل الأيدوكونيوم أكثر تقدماً من السبايروجيرا أو اليولوثركس ؟.



شكل – ١٠١ : دورة حياة *Oedogonium*

٤- قسم الطحالب البنية Phaeophyta:

وهي عبارة عن كائنات بحرية تقريباً يتراوح حجمها من المجهري إلى ١٠٠ متر في الطول. وإن معظم الأعشاب البحرية seaweeds البارزة في المناطق المعتدلة والتي تكون سائدة على الشواطئ الصخرية هي عبارة عن طحالب بنية. ويمكن الحصول من الطحالب البنية على عدة مركبات مهمة من الناحية التجارية مثل حامض aglinic acid الذي يستعمل كمادة مثبتة في الآيس كريم ice cream لجعله لين القوام. كما وتستعمل الطحالب البنية في صنع الأصباغ المقاومة للحريق، وفي مستحضرات التجميل cosmetics والمستحضرات الصيدلانية pharmaceuticals. وتعد الطحالب البنية في العديد من مناطق العالم مصدراً غذائياً مهماً. ففي البلدان الشرقية تتم تنمية طحلب اللاميناريا *Laminaria* على الحبال المعلقة بين أعمدة أشجار الخيزران. ويتم تحضير منتجات غذائية من هذه الطحالب تدعى kimbri الذي يعد المصدر الغذائي في اليابان.

يوجد عشب بحري عملاق يدعى بالماكروسيستس *Macrocystis* تتم زراعته على ساحل كاليفورنيا على أساس التجربة لتحديد كفائته كمصدر لوقود الميثان methane fuel.

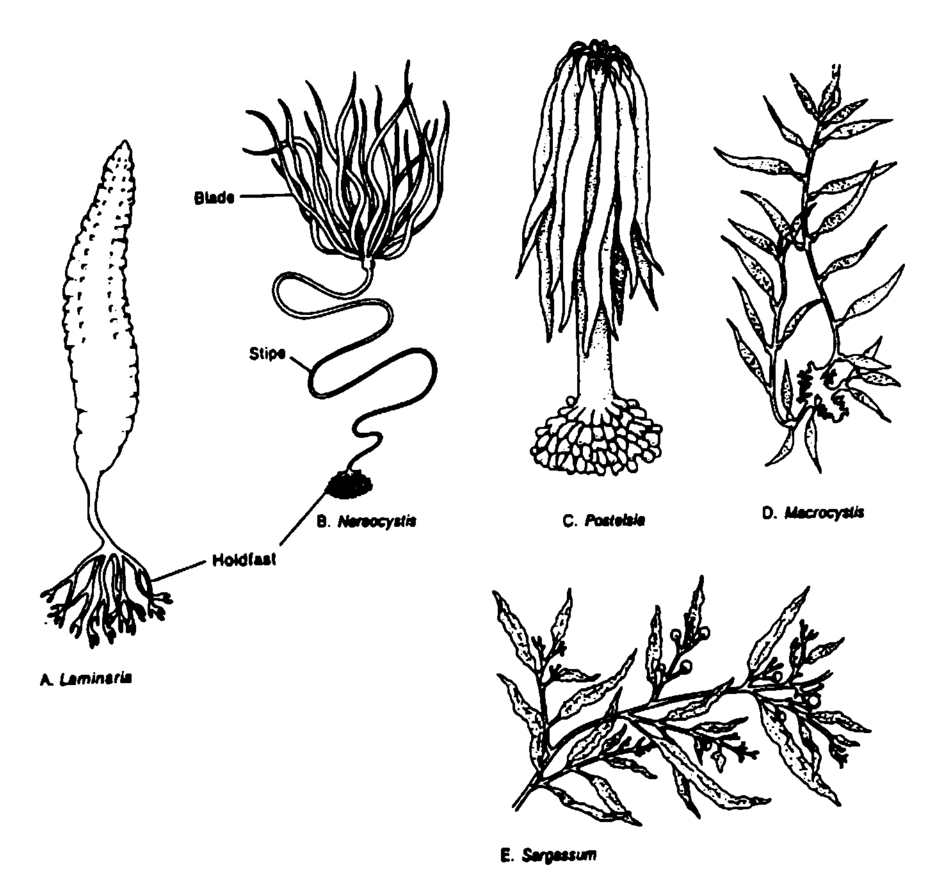
افحص عينات من الطحالب البنية ولاحظ التغايرات الموجودة في حجم الثالوس وتعقيده. وإن العديد من الأعشاب البحرية kelps (الشكل-١٠٢) تتمايز خارجياً إلى أجزاء تشبه الجذور (المثبت holdfast) والسيقان (السويقة stipe) والأوراق (ورقة العشب blade). ولاحظ احتواء العديد من العينات على أكياس ممتلئة بالهواء. كيف يمكن لهذه الأكياس أن تفيد الكائن الحي ؟.

افحص الطحلب البني الطافي المعروف باسم سركاسام *Sargassum* الموجود في المياه الاستوائية (الشكل-١٠٢). ويوجد ثالوس هذا الطحلب بأعداد كبيرة قد يمتد لأكثر من آلاف الأيكرات acres في سطح المحيط (الأيكر مقياس للمساحة يساوي تقريباً أربعة آلاف متر مربع). وإن بحر السركاس Sargasso sea في منتصف المحيط الأطلسي قد اشتق اسمه من هذا الطحلب.

٥- قسم الطحالب الحمراء Rhodophyta:

وهي عبارة عن كائنات حية بحرية بشكل رئيس كما هو الحال في الطحالب البنية. ومع أن هذه الكائنات أحياناً ما توجد في المناطق الباردة إلا أنها أكثر توفراً في المياه الاستوائية والدافئة. وعلى العكس من الطحالب البنية فإن الطحالب الحمراء تنمو دائماً وهي مرتبطة بالأجسام الصلبة وعادة تحت مستوى المدّ tide level. وتوجد هذه الطحالب في أعماق كبيرة في المياه الدافئة تتراوح ١٠٠ – ٢٠٠ متر تحت مستوى سطح الماء بالمقارنة مع بقية مجاميع الطحالب. وإن صبغات الفايكوبيلين phycobilin pigments (الفايكوايثرين phycoerythrin والفايكوسيانين phycocyanin) تحجب لون الكلوروفيل a وتكسب هذه الطحالب اللون الأحمر المتميز.

ويمكن لهذه الصبغات امتصاص الأطوال الموجية للضوء والتي تخترق عميقاً داخل الماء.



شكل – ١٠٢: الطحالب البنية

يكون الثالوس في الطحالب الحمراء مماثلاً لذلك الموجود في الطحالب البنية من حيث كونه مؤلفاً من المثبت والسويقة وورقة العشب. وفي بعض الطحالب الحمراء المعروفة بالطحالب المرجانية Corallines يتشرب الثالوس بحجر الكلس limestone بشكل كبير، لذا يعد ثالوس الطحالب المرجانية مهما في تكوين الحيود البحرية المرجانية coral reefs والجزيرات المرجانية atolls كما هو الحال في الحيوانات المرجانية. وتقوم الطحالب الحمراء بتكوين الخلية التي تعطي الأكار agar الذي يستعمل على نطاق واسع في المختبرات لزراعة البكتريا والفطريات وبعض النباتات الراقية. كما أن الكاراجينان Carrageenan عبارة عن مادة غروانية تستعمل كمادة مستحلبة emulsifying agent في منتجات الحليب مثل حليب الشوكولاته إذ أن هذه المادة تمنع الشكولاتة من الترسب.

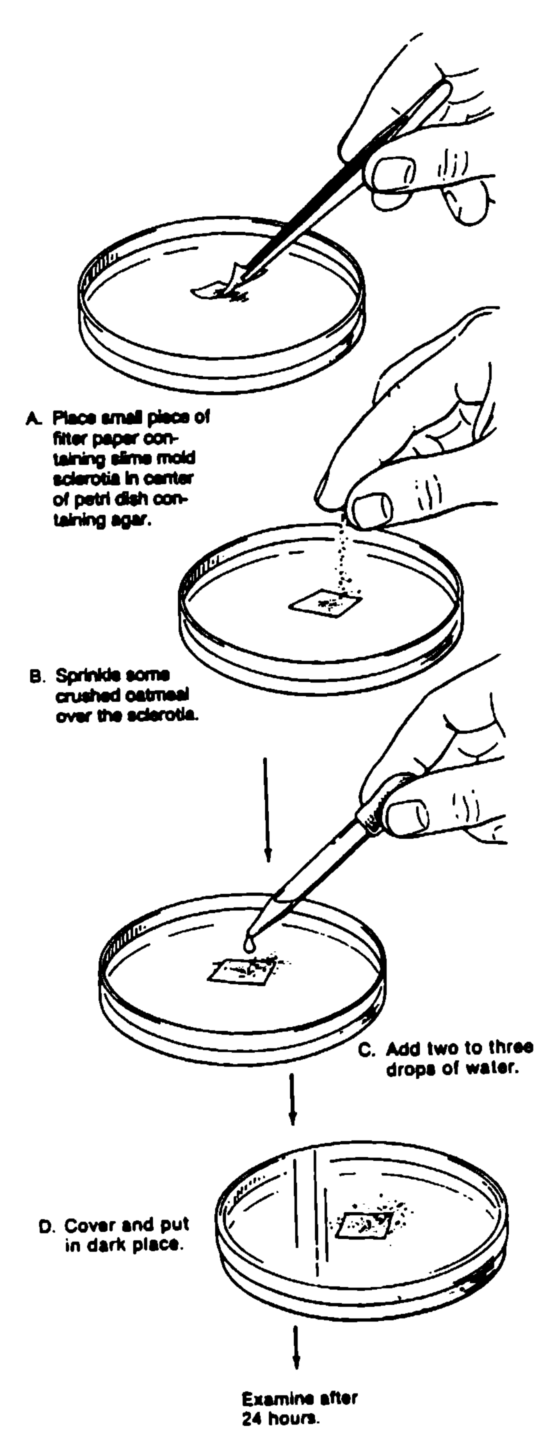
يستعمل الطحلب الأحمر المعروف بالبورفايرا *Porphyra* كمادة غذائية في عدد من الأطباق الشرقية. وإن هذا الطحلب هو الذي يستعمل في تغطية الرز وأجزاء من السمك الطازج row fish في الطبق الياباني المعروف بالسيوشي sushi.

افحص عينات مختلفة من الطحالب الحمراء.

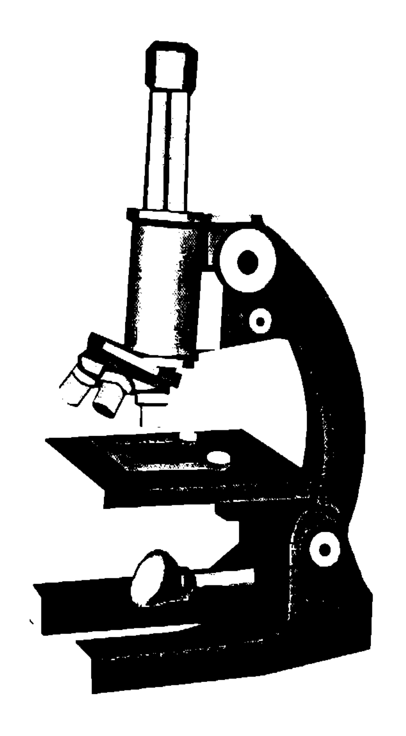
ب- الفطريات الغروية الرغوية (Division Myxomycota):

تُصنف الفطريات الغروية إلى مجموعتين على أساس شكل مرحلة التغذية الخضرية vegetative feeding phase في دورات الحياة. ونظراً لكون المرحلة الخضرية للفطريات الغروية الخلوية تتألف من كتل من خلايا أميبية منفردة، فقد اعتقد بأن لها صلة وثيقة بالأميبا أكثر من أي مجموعة أخرى، لذا فقد تم تصنيفها بشكل ابتدائيات protozoa. وإن للفطريات الغروية الرغوية أو اللاخلوية مرحلة خضرية مؤلفة من كتل من البروتوبلازم (الرغويّات plasmodia) ذات حجم وشكل غير محدودين. ويعيش كلا نوعي الفطريات الغروية على المواد النباتية المتحللة وبشكل رئيس الأحياء المجهرية (لا سيما البكتريا) . ستلاحظ في هذا الجزء من المختبر نمو وتكوين التراكيب المثمرة fruiting structures للفطريات الغروية الرغوية. حاول الحصول على قطعة صغيرة من ورقة الترشيح المحتوية على طور السكون الجاف للفطر الغروي (السكليروشيا sclerotia). ضع الورقة على دقيق الشوفان oatmeal flakes على السكليروشيوم scleortium ثم رطّب دقيق الشوفان بقطرتين أو ثلاث قطرات من الماء. ضع غطاء طبق بتري واتركه في مكان مظلم. افحص الأطباق بعد ٢٤ ساعة لملاحظة نمو الفطر الغروي. افحص الفطر الغروي بعد بدء النمو بواسطة العدسة اليدوية والمجهر الستيريوسكوبي أو القوة الصغرى للمجهر المركب. أعطِ وصفاً لنمط الحركة السايتوبلازمية الملاحظة في رغوي plasmodium الفطر.

اثقب أحد فروع الفطر الغروي باستعمال ابرة وراقبه لبضع دقائق. وبعد أن يتغطى الطبق برغوي الفطر الغروي، إرفع غطاء الطبق جزئياً. يلاحظ أن الفطر الغروي سيبدأ بالجفاف ويبدأ بتكوين الأجسام المثمرة. افحص المزرعة culture في الأيام القليلة القادمة. أعطِ وصفاً لشكل الجسم المثمر المتكون.



شكل – ١٠٣: طريقة تنمية Slime mold



المختبر السادس عشر

مملكة البروتستا (القسم الثاني): الابتدائيات

Kingdom Protista II: Protozoa

إن الابتدائيات عبارة عن كائنات حية وحيدة الخلية مختلفة التغذية hetrotrophs تُظهر درجة بارزة من التنظيم على مستوى التراكيب الخلوية. إذ أن لهذه الكائنات تراكيب خلوية تدعى بالعضيات organelles . وتوجد الابتدائيات في مواقع متباينة. وإن معظمها حر المعيشة free - living، وتتواجد في المياه العذبة والبحرية. وإن هناك عدداً من الابتدائيات يتواجد في أجسام الكائنات الحية الأخرى بعلاقة تدعى المعايشة commensalism والتي فيها يستفيد أحد الكائنين والآخر لا يستفيد ولا يتضرر، وكذلك بعلاقة تدعى تبادل المنفعة mutualism (كِلا الكائنين يستفيدان من بعضهما)، بعلاقة تدعى الطفيلية (التطفلية) parasitism والتي فيها يستفيد أحد الكائنين والآخر يتضرر. ومن بين الشعب phyla الخمسة للابتدائيات ستقوم بدراسة أربعة منها في هذا الدرس العملي.

* شعبة حاملة الأسواط Mastigophora (السوطيات Flagellates):

تتحرك كائنات هذه الشعبة بواسطة سوط واحد أو أكثر.

* شعبة حاملة الأهداب Ciliophora (الهدبيات Ciliates:

تتحرك كائنات هذه الشعبة بواسطة الأهداب. وتحتوي على نوى كبيرة وأخرى صغيرة ولها أسلوب تكاثر غير اعتيادي.

* شعبة الساركودينا Sarcodina (الأميبا والأشكال ذات العلاقة):

لا تحتوي كائنات هذه الشعبة على أهداب أو أسواط، وإنها تتحرك وتتغذى من خلال امتدادات سايتوبلازمية غير منتظمة تدعى بالأقدام الكاذبة pseudopodia . ولا يوجد شكل محدد للجسم. وإن البعض منها يقوم بتكوين أغلفة قشرية shells.

* شعبة البوغيات Sporozoa:

وهي عبارة عن كائنات طفيلية تعيش جزءً من دورة حياتها في خلايا الكائنات الأخرى. وإن لمعظمها دورات تكاثرية معقدة تتضمن التكاثر اللاجنسي والجنسي.

أ- شعبة حاملة الأسواط Mastigophora:

يتحرك أفراد هذه الشعبة بواسطة الأسواط. وإن القليل من السوطيات يكون حر المعيشة في المياه العذبة أو المالحة، إلا أن معظمها يعيش في أجسام النباتات والحيوانات الراقية.

١- الترايكونيمفا *Trichonympha*:

يتواجد الترايكونيمفا (الشكل-١٠٤) في أمعاء النمل الأبيض termites. ويتناول النمل الأبيض أجزاء صغيرة من الخشب إلا أنه ليس له القدرة على هضم السيلولوز cellulose الذي يعد المكون الرئيس للخشب. ويقوم الترايكونيمفا بتكوين أقدام كاذبة تعمل على التهام أجزاء الخشب الصغيرة التي تناولها النمل الأبيض. وبذلك يتم هضم الجدران الخلوية للخشب وتكوين كاربوهيدرات ذائبة يمكن للنمل الأبيض الاستفادة منها. ولا بد من الإشارة بأنه لا يمكن للنمل الأبيض أو الترايكونيمفا العيش دون الحاجة للكائن الآخر. افحص الشرائح الخاصة لهذا الكائن الحي، ولاحظ الأجزاء الصغيرة للخشب الموجودة في السايتوبلازم والأعداد الكبيرة للأسواط التي تغطي الجزء العلوي من الكائن الحي.

٢- التريبانوسوما *Trypamosoma*:

تتواجد التريبانوسوما (الشكل-١٠٤) في دم الحيوانات الفقرية وتنتقل من مضيف host إلى آخر بواسطة الحشرات الماصة للدم. فعلى سبيل المثال فإن التريبانوسوما المسببة لمرض النوم sleeping sickness في الإنسان في أفريقيا تنتقل بواسطة ذبابة التسي تسي الماصة للدم tse tse fly. افحص شرائح مصبوغة لمسح دموية للإنسان تحتوي على هذه السوطيات الطفيلية.

ب- شعبة حاملة الأهداب Ciliophora:

تعد الهدبيات كبيرة نسبياً ومعقدة بالمقارنة مع بقية الابتدائيات. وتتميز هذه الكائنات عن بقية الابتدائيات باحتوائها على الأهداب ونوعين من النوى

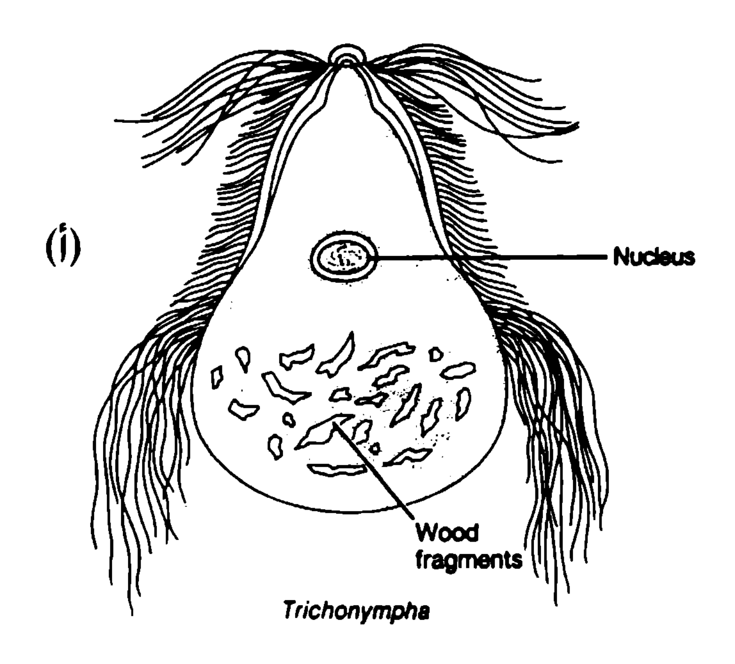
هما النواة الصغيرة micronucleus التي تسهم في عملية التكاثر والنواة الكبيرة macronucleus التي تسيطر على أيض الخلية ونموها. كما وإن هناك نوعاً من التكاثر يدعى بالاقتران conjugation بين حيوانين مع حدوث تبادل للمادة الوراثية. وإن معظم الهدبيات تكون حرة المعيشة وتتواجد بشكل عام في المياه العذبة والمالحة. أما القليل منها فيكون طفيلياً في الإنسان. وتلعب هذه الكائنات الحية دوراً في سلسلة الغذاء المائية من خلال كونها غذاءً للحيوانات الصغيرة متعددة الخلايا، وإن هذه الأخيرة يتم تناولها من قبل الحيوانات الكبيرة.

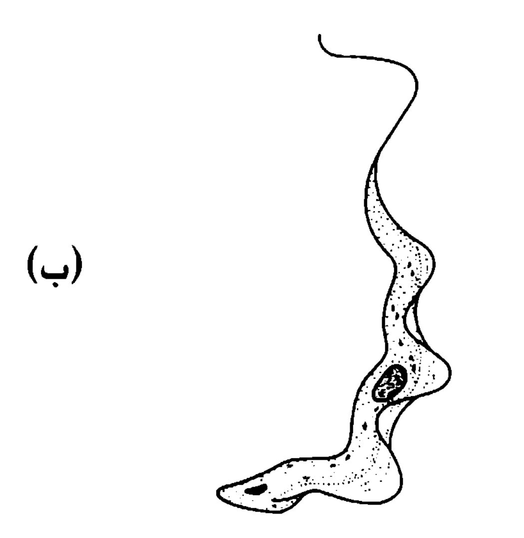
١- البراميسيوم *Paramecium caudatum*:

أ- الشكل المظهري Morphology:

يُستخدم البراميسيوم في الأغراض الدراسية بوصفه أحد الهدبيات النموذجية وسهولة الحصول عليه وسهولة ملاحظته بسبب حجمه. ويوجد هذا الحيوان الهدبي في مياه البرك المحتوية على كميات كبيرة من المواد النباتية المتحللة. ونظراً لسهولة تنمية البراميسيوم بأعداد كبيرة تحت الظروف المختبرية فإنه يستعمل على نطاق واسع في دراسات التغذية والسرطان والسلوك والوراثة وعلم البيئة.

ضع قطرة صغيرة من مزرعة البراميسيوم على شريحة جديدة ثم أضف قطرة صغيرة من المثيل سيلولوز لإبطاء حركة البراميسيوم. ضع غطاء الشريحة وافحص الشريحة مجهرياً باستعمال عدسة القوة الصغرى. ولا بد من تنظيم الحجاب القزحي iris diaphragm لزيادة التباين. وبمساعدة الشكل-١٠٥ والشرائح الجاهزة حدد مواقع التراكيب الآتية في الكائن الحي. يبدأ الأخدود الفمي oral groove قرب النهاية الأمامية ويمتد بشكل مائل باتجاه النهاية الخلفية مؤدياً إلى فم الخلية cytostome ثم بلعوم الخلية cytopharynx (gullet). ينتقل الغذاء إلى الأخدود الفمي من خلال حركة الأهداب التي يمكن ملاحظتها باستعمال عدسة القوة الكبرى وتنظيم الحجاب القزحي للحصول على تباين أكثر. وتقع الفجوة المتقلصة contractile vacuole عند نهايتي جسم الحيوان. هل إن هذه الفجوات متحركة أو ثابتة؟.

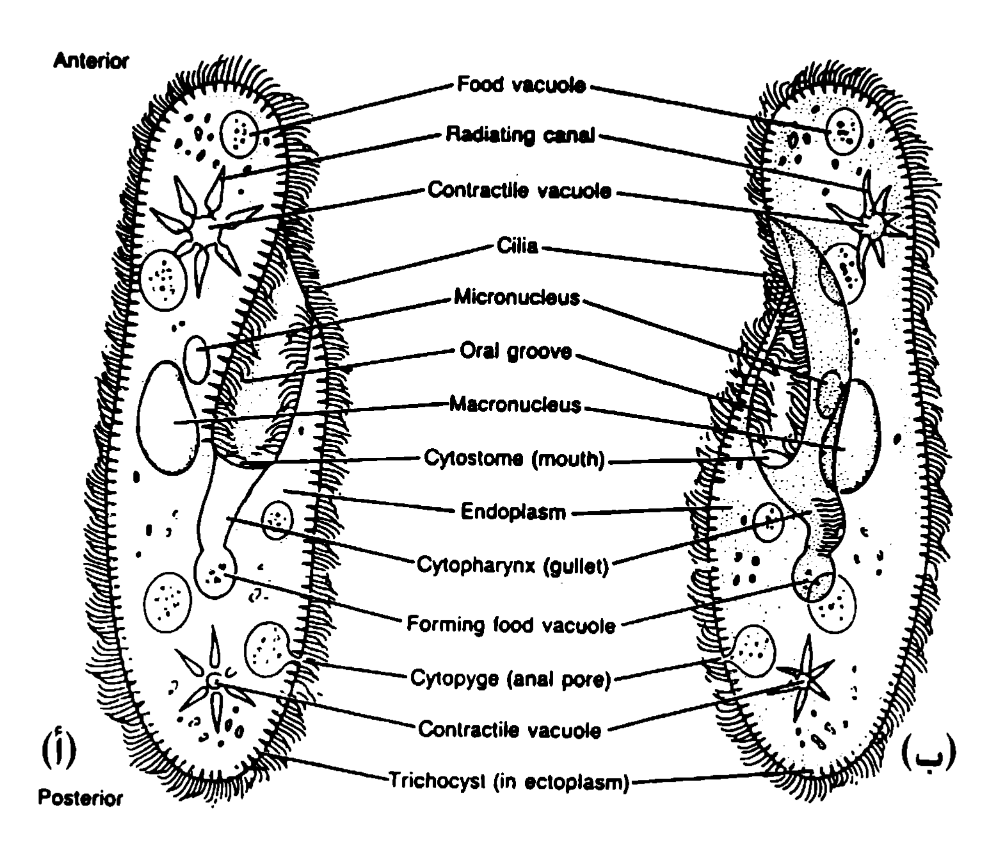




شكل – ١٠٤: أمثلة السوطيات.

(أ) الترايكونمفا وهي تعيش في داخل القناة الهضمية لحشرة الأرض.

(ب) التريبانوسوما وهي طفيليات تعيش في الدم وتسبب مرض النوم.



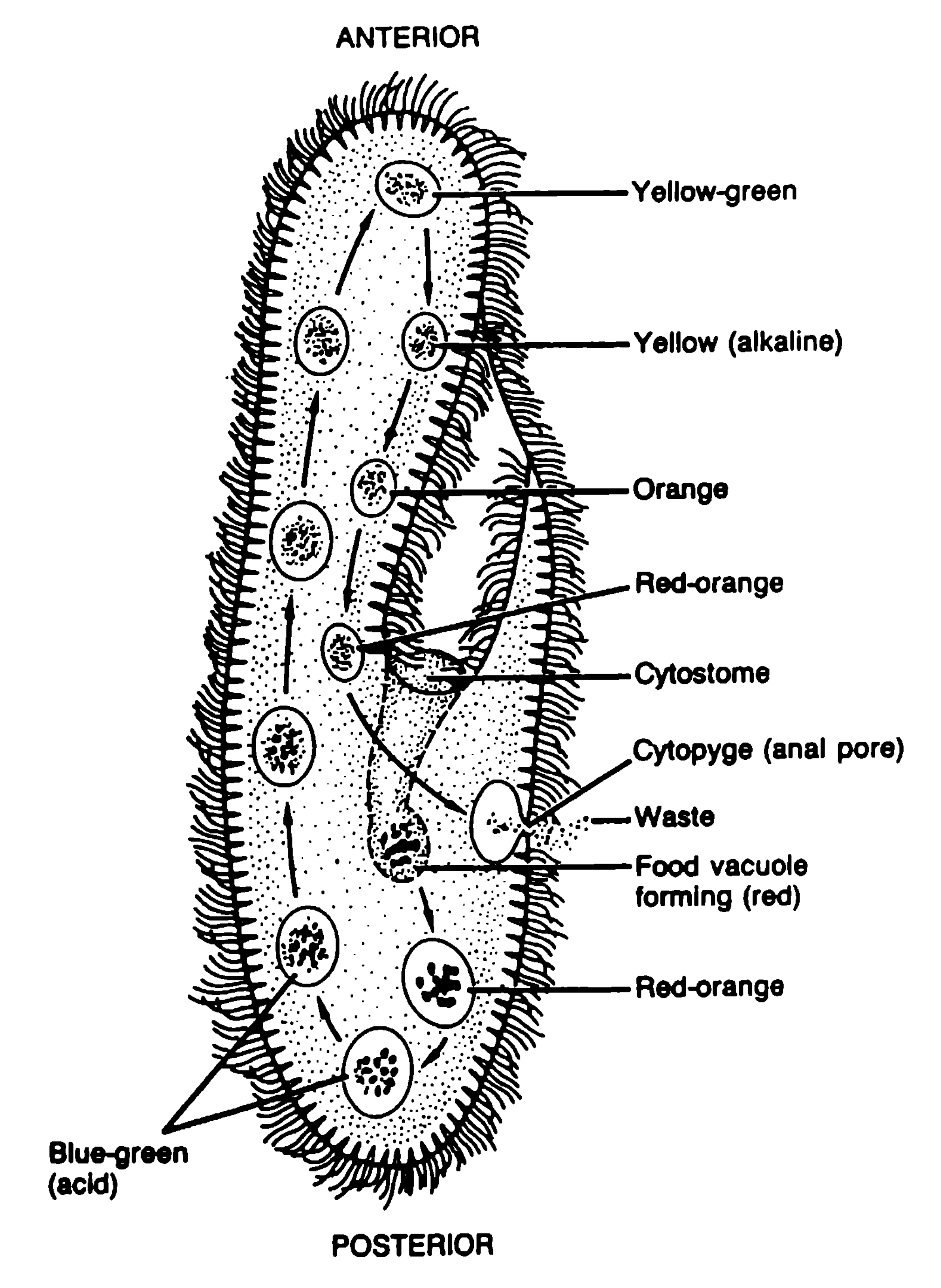
شكل – ١٠٥: البراميسيوم: (أ) منظر بطني. (ب) منظر جانبي.

هل إن هذه الفجوات تتقلص في الوقت نفسه أو بالتبادل ؟.

حدد مواقع القنوات التي تتشعع من كل فجوة. اقترح وظيفة لهذه التراكيب.

ما هي وظيفة الفجوات المتقلصة ؟.

يمكن ملاحظة النواة الكبيرة في الأندوبلازم endoplasm أما النواة الصغيرة فتقع قرب النواة الكبيرة. ويصعب ملاحظة هذه النوى في الحيوان الحي إلا أنه يمكن اصطباغها. أضف قطرة من صبغة الأسيتوكارمين acetocarmine أو المثيل الأخضر methyl green إلا أحد جوانب غطاء الشريحة، ثم اسحب هذه القطرة باستعمال ورقة ترشيح من الجانب الآخر. أكمل هذه الملاحظات باستعمال الشرائح الجاهزة المصبوغة لملاحظة النوى.



شكل – ١٠٦: المضم في البراميسيوم. توضح الأسهم مسار حركة الفجوات الغذائية

تقـع الأكيـاس الخملية (الأكيـاس الشـعرية) trichocysts في الأكتـوبلازم ectoplasm ، وهي عبارة عن تراكيب تشبه الجزر تحتـوي علـى خيـوط ملتفـة يمكـن إطلاقها، ويعتقد بأنها تساعد البراميسيوم في الإمساك بالكائنات الصغيرة والتغذي عليها. أضف قطرة من اليود أو حامض الخليك عند حافة غطاء الشـريحة، واتركهـا تتسرب تحت الغطاء ولاحظ انطلاق الخيوط من الأكياس الخملية.

ب- الغذاء والتغذية Nutrition and Feeding:

تتغذى معظم الابتدائيات وبضمنها البراميسـيوم تغذيـة حيوانيـة holozoic، أي أنها تتنـاول المـواد الغذائيـة الصـلبة مثـل الابتـدائيات الأخـرى والبكتريـا أو المـواد العضوية المتحللة detritus في المـاء. ولا بـد مـن هضـم هـذه الـدقائق الغذائيـة قبـل استعمالها في عمليات النمو والإصلاح أو التكاثر.

ضع قطرة من مزرعة البراميسيوم على شريحة زجاجية ثم أضف قطـرة صـغيرة من الخميرة المصبوغة بمادة الكونغو الأحمـر Congo red. (ملاحظـة: يجـب أن يكـون اللون المتكون قرنفلي (أحمر وردي) pink وليس أحمر). ضع قطرة من المثيل سيلولوز ثم ضع غطاء الشريحة. وافحص البراميسيوم باسـتعمال تكـبير عـال. لاحـظ دوامـة vortex الماء الناتجة عن حركة الأهداب قرب الأخدود الفمي والتي تعمل علـى نقـل الخميرة المصبوغة إلى الأخدود الفمي ثم إلى فم الخلية وبلعوم الخلية. ويلاحظ تكون فجوة غذائية food vacuole عند قاعدة بلعوم الخلية. وحال تكوّن هـذه الفجـوة يـتم نقلها من خلال الحركة الدورانيـة للسـايتوبلازم cyclosis ، مـع بـدء تكـوين فجـوة غذائية أخرى. وتتحرك الفجوات الغذائية في الكائن الحـي مـن خـلال مسـار محـدد (الشكل-١٠٦)، إذ أنها تمر في البداية إلى الجزء الخلفي من الجسـم ثـم الأمـامي ثـم الخلفي إلى منطقة الأخدود الفمي ، حيث يـتم طـرح المحتويـات غـير المهضـومة مـن خلال الفتحة الشرجية anal pore (cytopyge).

حدد موقع الفجوة الغذائية. لاحظ اللون الأحمر البرتقالي لهذه الفجوة عند بدء تكونها، ثم تتبع حركة هذه الفجوة خلال حركتها في جسم الحيوان ولاحظ أنه خلال

عملية الهضم يتغير لون محتوياتها من الأحمر البرتقالي إلى الأزرق المخضر ثم الأصفر المخضر ثم الأصفر وأخيراً الأحمر البرتقالي. ويعود سبب هـذا الـتغير اللـوني إلى أن الكونغو الأحمر عبارة عن صبغة كاشفة يتغير لونها بتغير الأس الهيدروجيني (pH)، إذ يكون لون هذه الصبغة أزرق مخضر في الحالات الحامضية وأحمر برتقالي في الحـالات القاعدية. ماذا يدل ذلك حول تغير الرقم الهيدروجيني للفجوة الغذائية عند حركتهـا في جسم البراميسيوم ؟.

ما هو التشابه الموجود بين الـرقم الهيـدروجيني للفجـوة الغذائيـة عنـد مرورهـا داخل البراميسيوم وذلك الموجود في الفم والمعدة والأمعاء في حالة الإنسان؟.

جـ- التكـاثر Reproduction:

إن التكاثر الأكثر شيوعاً في الابتدائيات هـو الانشـطار الثنـائي binary fission. وفي هذا النوع من التكاثر اللاجنسـي تنقسـم الخليـة إلى خليـتين وليـدتين متمـاثلتين وراثيـاً. وفي السـوطيات يكـون مسـتوى الانقسـام طوليـاً أمـا في الهـدبيات فيكـون مستعرضاً. افحص شرائح للبراميسيوم توضح المراحل المختلفة من الانشطار الثنـائي (الشكل-١٠٧).

يتكاثر البراميسيوم في بعض الأحيان جنسياً من خلال عملية الاقتران (الشكل-١٠٨) الـتي تتبـادل فيهـا النـوى الصـغيرة. ويمكنـك ملاحظـة عمليـة الاقـتران في البراميسيوم من خلال إنجاز الطريقـة الآتيـة. ولغـرض القيـام بهـذه الطريقـة سيـتم استعمال ضروب تزاوجية من البراميسـيوم بورسـاريا *Paramecium bursaria* الـذي يتعايش مع الطحالب الخضراء . أكمل ملاحظاتك بفحـص شـرائح جـاهزة توضـح المراحل المختلفة من عملية الاقتران. ضع قطرة صغيرة من أحد الضروب التزاوجيـة mating strains في منخفض لشريحة زجاجية. أضـف قطـرة مـن الضـرب التزاوجـي الثاني في الوقت الذي تلاحظ فيه البراميسـيوم باسـتعمال المجهـر الاستيريوسـكوبي. وسـوف تلاحـظ في الحـال حـدوث تـلازن agglutination (أو التجمـع clumping) للضربين التزاوجيين والذي يعمل على تقارب الخلايا من بعضها لنقل المادة الوراثية.

ضع الشريحة في صحن بتري مغطى يحتوي على ورق ترشيح رطب لمنع جفاف المزرعة. افحص الشريحة بشكل دوري. ويمكن ملاحظة الاقتران في البراميسيوم لغاية ٤٨ ساعة، بعدها يلاحظ القليل من هذه الحيوانات المقترنة أوقد لا تلاحظ حيوانات مقترنة conjugants.

٢- هدبيات أخرى Other Ciliates:

حاول الحصول على عينات من الهدبيات الآتية وافحصها مجهرياً.

أ- الستينتور *Stentor*:

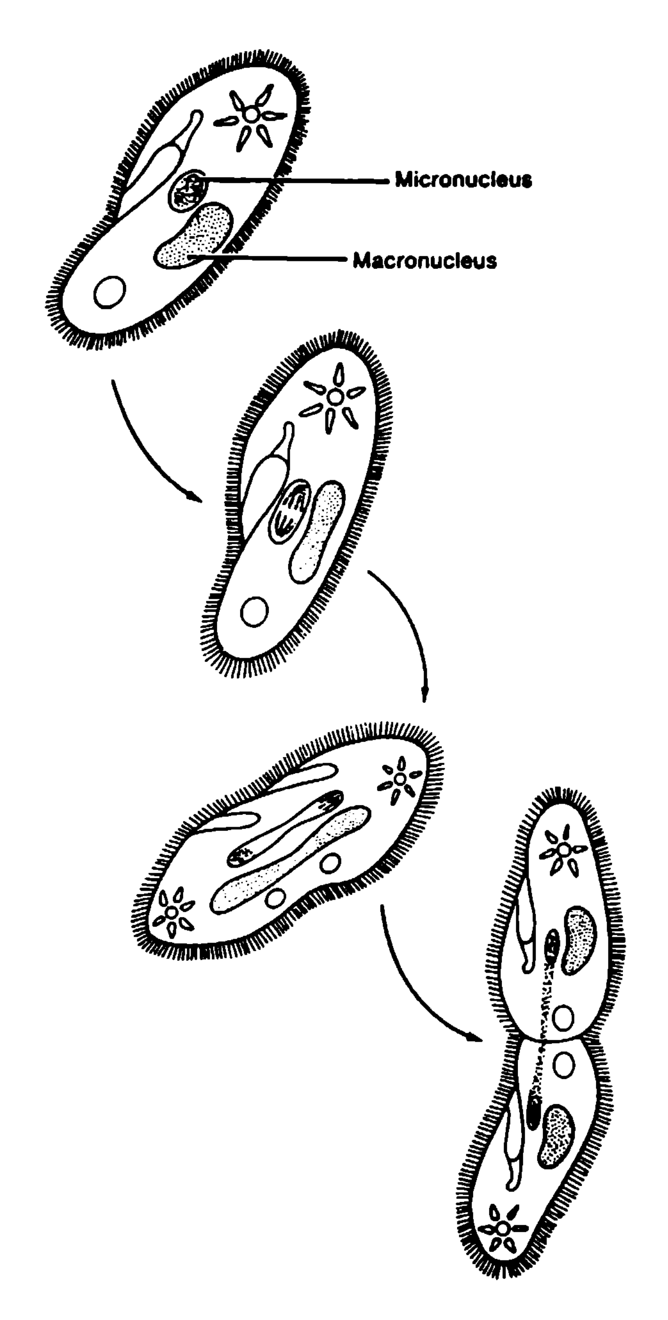
إن هذا الكائن الحي يشبه البوق trumpet - shaped ، ويكون لونه أزرقاً عندما يكون حياً وله نواة كبيرة تشبه خيط السبحة (خيط من الخرز) (الشكل-١٠٩). ويتم جلب الغذاء إلى فم الخلية من خلال حركة الأهداب.

ب- الفورتيسيلا *Vorticella*:

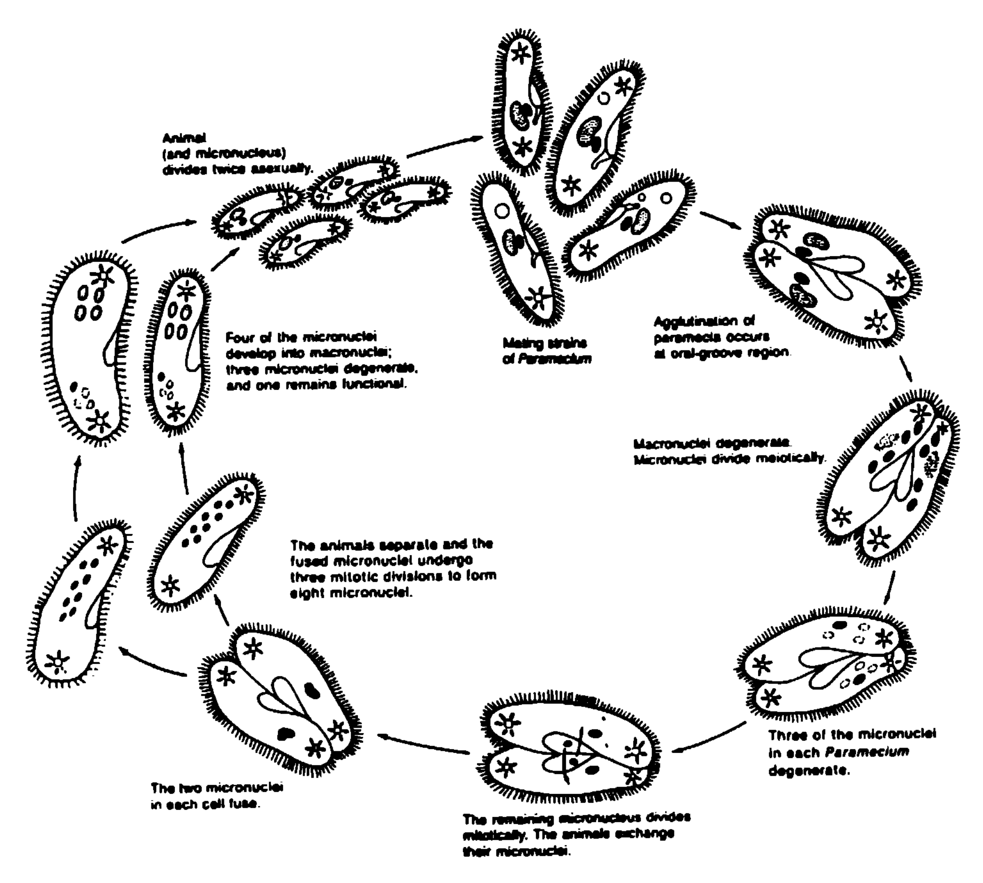
يعيش هذا الحيوان الهدبي في المياه العذبة freshwater، وهو يماثل الجرس المقلوب المرتبط بسويق stalk يثبته بالنبات والصخور المغمورة (الشكل-١٠٩). حدد موقع الكائن الحي الذي يكون فيه السويق مستقيماً وممتداً. حاول إزالة بلطف في الوقت الذي تراقب فيه الحيوان واذكر ماذا يحدث.

جـ- البلانتيديوم القولونية *Balantidium coli*:

يعد البلانتيديوم (الشكل-١٠٩) الطفيلي الهدبي الوحيد في جسم الإنسان. إذ أنه يحفر في جدار القولون ويسبب القرحة ulcer. وإن البلانتيديوم هو من الكائنات المسببة للمرض pathogenic إذ أنه قد يؤدي إلى إحداث أعراض مماثلة لتلك الموجودة في حالة الزحار الأميبي amoebic dysentery وإن مصدر الإصابة الأكثر شيوعاً هو لحم الخنزير غير المطبوخ.



شكل – ١٠٧ : التكاثر اللاجنسي (الانشطار الثنائي) في البراميسيوم. لاحظ بأن النواة الصغيرة micronucleas تنقسم بواسطة خيوط المغزل mitotic spindle في حين أن النواة الكبيرة macronucleus تنقسم بشكل عشوائي ويسحب كل جزء إلى الطرف المقابل



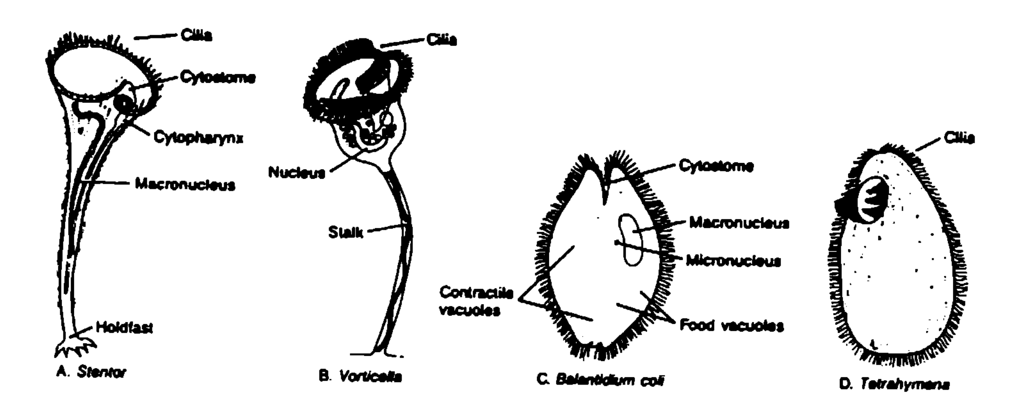
شكل – ١٠٨: مراحل التكاثر الجنسي (الاقتران conjugation) في البراميسيوم

افحص شرائح جاهزة من البلانتيديوم القولونية ولاحظ تغطية الجسم بأهداب مرتبة بشكل صفوف. وتكون النواة الكبيرة منحنية قليلاً وترتبط مع نواة صغيرة جداً. وتنتقل الدقائق الغذائية إلى فم الخلية من خلال التيارات التي تحدثها حركة الأهداب. ويلاحظ وجود فجوتين متقلصتين وفجوات غذائية تدور في السايتوبلازم. وكما هو الحال في بقية الهدبيات فإن البلانتيديوم ينقسم بالانشطار المستعرض.

د- التتراهايمنا *Tetrahymena*:

لقد استعمل هذا الحيوان الهدبي على نطاق واسع في الدراسات الفسلجية والوراثية وذلك لسهولة نموه في المزارع الخالصة (النقية) pure cultures (الشكل-١٠٩). ويعد هذا الحيوان من الوسائل المفيدة في دراسة تفاصيل عملية الانقسام

الاعتيادي وذلك لامكانية تزامن انقسامات الاعتيادية بصدمات حرارية heat shocks مناسبة. افحص عينات حية أو شرائح جاهزة من التتراهايمنا.



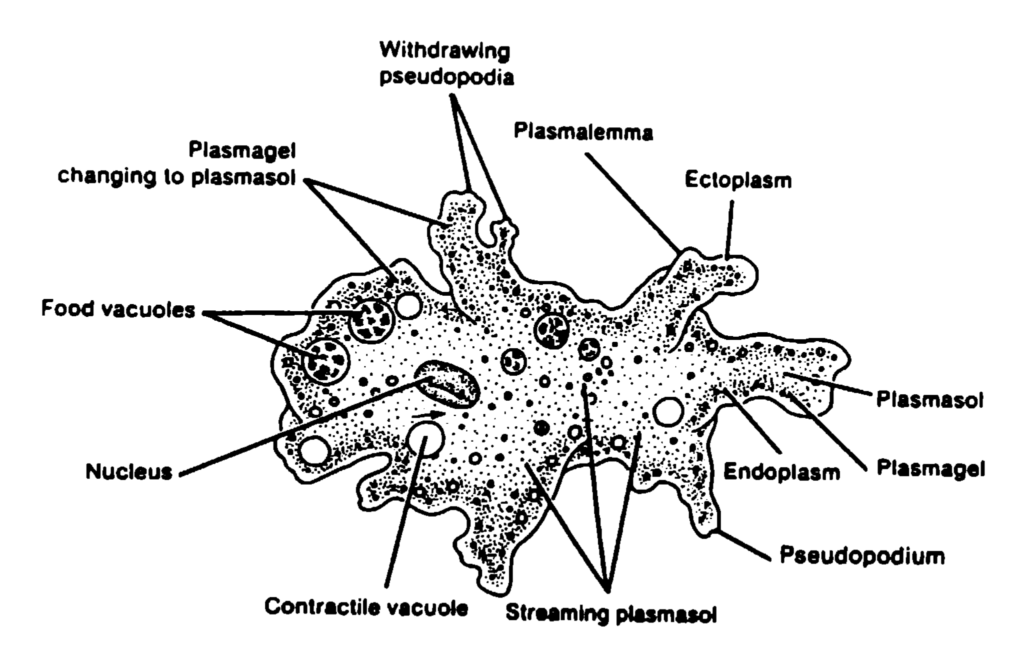
شكل – ١٠٩: أنواع الهدبيات.

جـ- شعبة الساركودينا *Sarcodina*:

١- الأميبا *Amoeba*:

توجد الأميبا في برك وجداول المياه العذبة. ويظهر هذا الكائن الحي تحت المجهر بشكل كتل رمادية غير منتظمة تغير شكلها بشكل مستمر من خلال تراكيب إصبعية الشكل تدعى بالأقدام الكاذبة pseudopodia (الشكل-١١٠).

حاول الحصول على عينة من الأميبا من قعر طبق المزرعة الذي تتجمع فيه الأميبا وذلك باستعمال قطارة نظيفة. ضع بضع قطرات من المزرعة في منخفض موجود في الشريحة أو ضع بضع قطرات من هذه المزرعة على شريحة زجاجية ثم أضف إليها أجزاء صغيرة من بقايا المزرعة أو بضع حبات من الرمل أو أجزاء صغيرة من أغطية الشرائح المكسورة وذلك لمنع انسحاق الأميبا عند وضع الغطاء على الشريحة. افحص الأميبا في المزرعة باستعمال المجهر الاستيريوسكوبي وتنظيم شدة الضوء لملاحظة الأبعاد الثلاثة للأميبا.



شكل – ١١٠: الأميبا.

ادرس المستحضر باستعمال عدسة القوة الصغرى (10X) للمجهر المركب. ولابد من تقليل كمية الإضاءة من خلال إغلاق الحجاب القزحي وذلك لأن الأميبا تكون شفافة تقريباً بحيث لا يمكن رؤيتها تحت الضوء الساطع. حدد مواقع التراكيب المختلفة في الأميبا باستعمال الشرائح الجاهزة والشكل ١١٠. لاحظ الأقدام الكاذبة والأندوبلازم الذي يمثل المادة الداخلية الحبيبية المكونة لمعظم السايتوبلازم. أما الأكتوبلازم فهو عبارة عن طبقة رقيقة من السايتوبلازم تحيط بالاندوبلازم. وتحاط الخلية بغشاء خلوي (الغشاء البلازمي plasmalemma). وتدعى الطبقة الخارجية الهلامية الشكل من الاندوبلازم باسم الهلام البلازمي plasmagel، أما المنطقة السائلة المركزية من الأندوبلازم فتدعى plasmasol. وإن النواة عبارة عن تركيب شفاف نوعما تظهر في بعض الحالات بشكل مجعد أو ذو طيات. أما الفجوات المتقلصة فهي عبارة عن تراكيب كروية واضحة توجد في السايتوبلازم تقوم بجمع الماء من الخلية وتطرحه إلى الخارج. وتعمل هذه الفجوات على المحافظة على التوازن المائي في الخلية. هل تتوقع احتواء الأشكال البحرية من الأميبا على فجوات متقلصة؟ وضح ذلك.

تحتوي الفجوات الغذائية على الغذاء المتناول والإنزيمات المسؤولة عن عملية الهضم. ما هي الآلية التي تتكون من خلالها هذه الفجوات الغذائية؟

ما هي علاقة اللايسوسومات بالفجوات الغذائية؟

كيف يتم توفير نواتج عملية الهضم للخلية ؟.

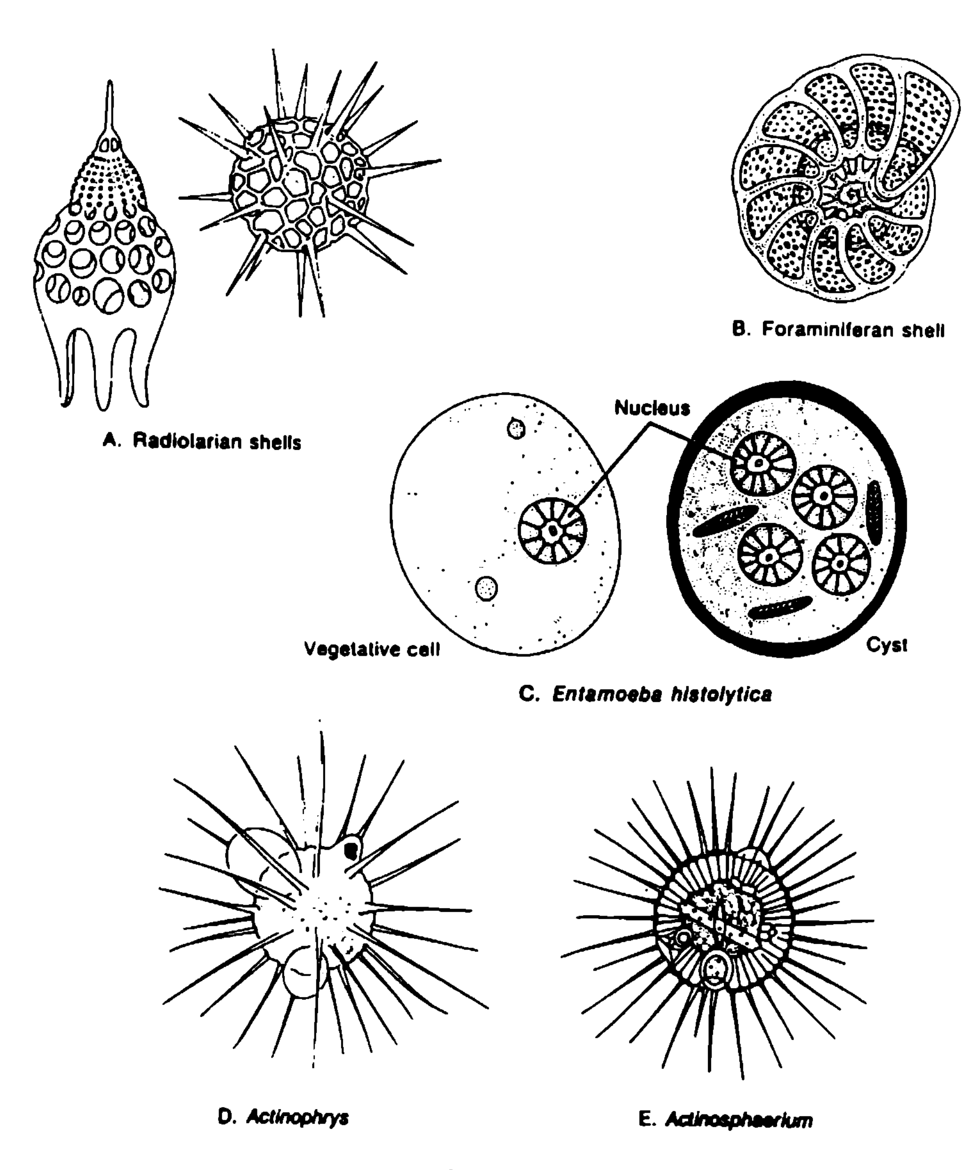
تتكاثر الأميبا بعملية الانشطار الثنائي التي ينقسم فيها السايتوبلازم والنواة لتكوين خليتين وليدتين متماثلتين وراثياً.

٢- أنواع أخرى من الساركودينا:

إن الحيوانات radiolarians (الشكل-١١١) عبارة عن أميبات لها هياكل من السيليكا الذي يفرزه السايتوبلازم. وتتخذ هذه الهياكل أشكالاً شبكية تمتد من خلالها أشواك شعاعية صلبة. وعندما تموت هذه الابتدائيات فإنها تتساقط إلى قعر المحيط وتنضغط في النهاية مكونة الصخور السيليكونية. افحص شرائح جاهزة لهياكل حيوانات الراديولاريا.

أما الحيوانات foraminiferans (الشكل-١١١) فهي عبارة عن مجموعة كبيرة من الأميبات البحرية تفرز أصداف shells مماثلة لأصداف القواقع مكونة من كاربونات الكالسيوم. وتحتوي الصَدَفة على ثقوب صغيرة تمتد من خلالها أقدام كاذبة طويلة تستخدم في عملية التغذية. وعندما تموت هذه الحيوانات فإنها تنزل إلى أرض المحيط حيث تكوّن أصدافها طيناً رمادياً يتحول تدريجياً إلى مادة طباشيرية chalk. افحص شرائح جاهزة لمختلف أصداف الفورامنيفرا.

تعد الانتاميبا هستوليتيكا *Entamoeba histolytica* (الشكل-١١١) الكائن الحي الذي يسبب الزحار الأميبي amoebic dysentery. افحص شرائح جاهزة للأطوار الفعالة (الخضرية) active (vegetative) والأكياس cysts (الأطوار المعدية المقاومة resistant, infective stages). للكائن الحي. وعندما يكون الكائن الحي في الطور الخضري فإنه يحتوي على نواة منفردة؛ أما الأكياس فتحتوي على أربع نوى وجدار سميك يحيط الخلية بأكملها.



شكل – ١١١: أنواع من الأميبات Sarcodina.

يعـــود الأكتينـــوفريس Actinophrys والأكتينوســـفيريوم *Actinosphaerium* (الشكل-١١١) إلى مجموعة من الأميبات الكروية ذات الأقدام الكاذبة الدقيقـة الـتي تدعمها قضبان محورية. وتعيش معظم أنواع هذه المجموعـة مـن الابتـدائيات في المـاء العذب. افحص شـرائح للأكتينوسـفيريوم والأكتينـوفريس ولاحـظ بشـكل خـاص

الأقدام الكاذبة الدقيقة والتي من خلالها اطلق على هذه الحيوانات الشمس الجهرية "sun animalcules"

د- شعبة البوغيات *Sporozoa*:

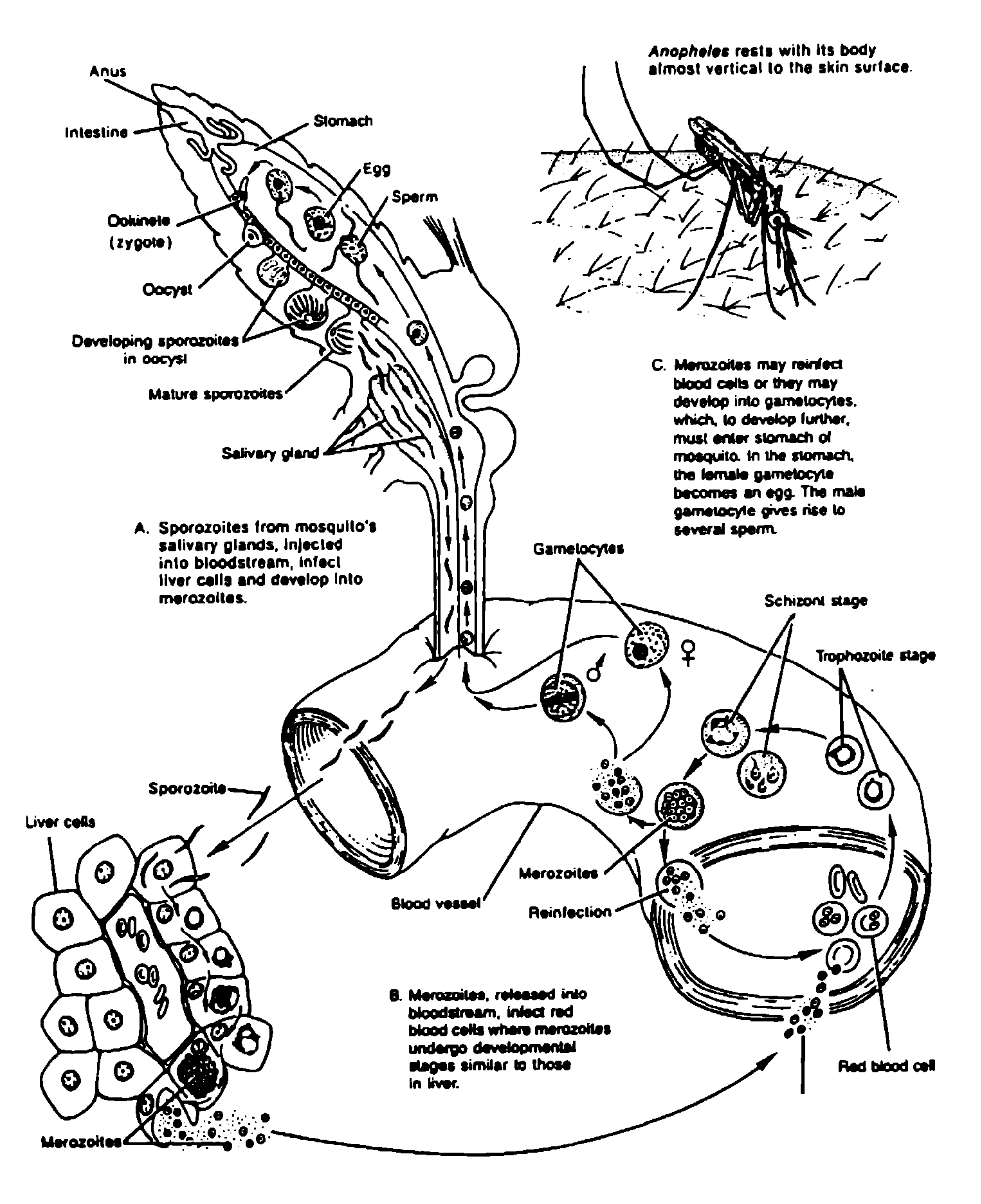
إن جميع أفراد هذه الشعبة عبارة عن كائنات حية طفيلية يمكن أن تصيب إي مجموعة رئيسة من المملكة الحيوانية ابتداءً من اللافقريات البسيطة إلى الإنسان. وفي هذا المختبر ستقوم بدراسة طفيلي الملاريا النشيطة *Plasmodium vivax*.

تعد الملاريا malaria إحدى الأمراض المدمِّرة للإنسان من حيث أمراضيتها والوفيات mortality التي تسببها والخسائر الاقتصادية. وتوجد أربعة أنواع من الملاريا. فالملاريا الثلثية الحميدة benign tertian malaria يسببها طفيلي الملاريا النشيطة *Plasmodium vivax*، وتتميز بتكرار الحمى كل ٤٨ ساعة. وهناك طفيلي الملاريا البيضوية *Plasmodium ovale* الذي يسبب الحمى كل ٤٨ ساعة . أما الملاريا الربعية quartan malaria فيسببها طفيلي الملاريا الوبالي *Plasmodium malariae*، وتتميز عادة بتكرار الحمى كل ٧٢ ساعة،بينما يؤدي طفيلي الملاريا المنجلية *Plasmodium falciparum* إلى إحداث الملاريا الخبيثة pernicious malaria والتي تكون فيها الحمى مستمرة وأعلى نسبة وفيات فيها.

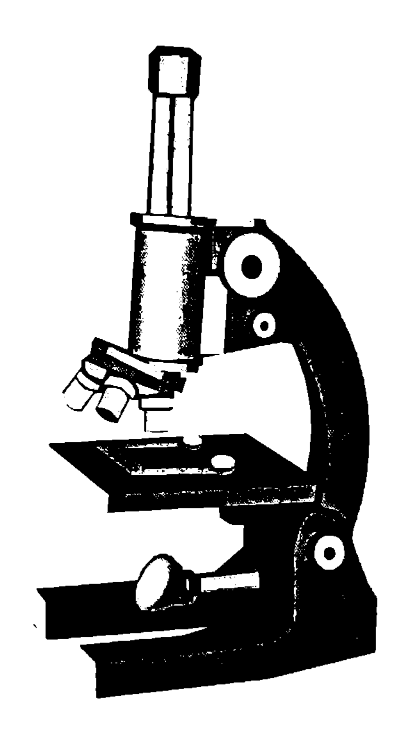
نظراً لتشابه دورات حياة الأربعة أنواع من الملاريا فستتم دراسة أحد الأنواع الذي يمثلها وهو طفيلي الملاريا النشيطة. ارجع إلى الشكل-١١٢ والشرائح الجاهزة للأطوار المختلفة من دورة الحياة.

تنتقل الملاريا من خلال لسعة أنثى البعوض؛ أما ذكور البعوض فلا يمكنهم إحداث الإصابة بسبب فقدانهم لأجزاء الفم الثاقبة للجلد والماصة للدم. ويمكن أن تصاب العديد من الحيوانات بالملاريا التي يتم نقلها بأنواع مختلفة من البعوض. ويتم نقل طفيلي الملاريا إلى الإنسان بواسطة أنثى بعوض جنس الأنوفيليس *Anopheles*. فعندما تخترق أجزاء فم البعوضة الجلد، فإن اللعاب المحتوي على مانعات التخثر يدخل إلى الجرح. فإذا كانت هذه البعوضة تحمل الطور المُعدي من طفيلي الملاريا المعروف بالسبوروزويت sporozoite فإنه سوف يدخل إلى مجرى الدم (الشكل-

١١٢) إلا أنه لا يخترق خلايا الدم الحمر. بعد ذلك يدخل إلى خلايا الكبد حيث تنمو وتتكاثر مكونة الميروزويتات merozoites. وعند تحرر هذه الميروزويتات من خلايا الكبد فإنها تدخل إلى مجرى الدم وتخترق خلايا الدم الحمر وتصبح حلقية الشكل ثم غير منتظمة الشكل. ويدعى الطفيلي في هذا الطور بالتروفوزويت trophozoite (الشكل-١١٢). ويمر التروفوزويت بمرحلة النضج، ويعتمد الوقت اللازم للنضج على نوع الطفيلي ، بعدها ينقسم التروفوزويت بنوع من الانشطار يدعى بالتكاثر الانفلاقي schizogony لتكوين المزيد من الميروزويتات (الشكل-١١٢). وبفترات منتظمة تعتمد على نوع طفيلي الملاريا تنفجر خلايا الدم الحمر المصابة بالطفيلي محررة الميروزويتات. وإن المواد السامة المتحررة مع الميروزويتات هي المسؤولة عن القشعريرة chill والحمى المميزة لنوبات الملاريا. وإن كل ميروزويت يخترق بدوره خلية حمراء أخرى ويصبح بشكل تروفوزويت. وتتكر هذه الدورة عدة مرات تزداد فيها أعداد خلايا الدم الحمر المصابة. وأخيراً يتطور بعض الميروزويتات إلى خلايا مشيجية gametocytes ذكرية وأنثوية (الشكل-١١٢) بدلاً من أن تصبح تروفوزويتات. وطالما بقيت الخلايا المشيجية في الإنسان فإنها ليست بذات أهمية. أما في حالة امتصاصها بواسطة بعوضة الأنوفيليس فإنها تمر إلى معدة الحشرة وتصبح فعالة. إذ تتطور الخلية المشيجية الأنثوية إلى بيضة واحدة؛ أما الخلية المشيجية الذكرية فتعطي عدة نطف بعملية تدعى exflagellation (تكوين الأسواط بواسطة الابتدائيات). ويؤدي اتحاد البيضة بالنطفة إلى تكوين البيضة المخصبة المعروفة باسم الأووكنيت ookinete والذي ينتقل خلال بطانة المعدة حيث ينطمر في جدارها. وتمر النواة بانقسامات اعتيادية متتالية مكونة أعداد كبيرة من السبوروزويتات (البويغات) الموجودة ضمن تركيب يدعى بكيس البيضة oocyst. وعندما يتحطم كيس البيضة تدخل السبوروزويتات إلى تجويف جسم البعوضة تنتقل بعدها إلى الغدد اللعابية. وعندما تلسع هذه البعوضة المضيف تنتقل السبوروزويتات إلى جسم الإنسان وتتكرر دورة الحياة مرة أخرى.



شكل – ١١٢ : دورة حياة البلازموديوم فيفاكس *Plasmodium vivax* المسبب للملاريا.



المختبر السابع عشر

مملكة الفطريات

Kingdom Fungi

تعد الفطريات وبعض البكتريا من الكائنات المحللة decomposers، وتتوازى أهميتها في المحيط الحيوي biosphere مع الكائنات المنتجة الغذائية food producers. وتؤدي عمليات الأيض الجارية في الفطريات إلى تحرير ثنائي أوكسيد الكاربون إلى الهواء الجوي والمواد النتروجينية إلى التربة والمياه السطحية للاستفادة منها من قبل النباتات الخضراء. وتقوم الحيوانات بالاستفادة من هذه النباتات.

تعد الفطريات كائنات أرضية بشكل رئيس. وإن البعض منها وحيد الخلية، إلا أن معظمها يكون خيطياً وقد يتنظم بأشكال ذات تراكيب معينة كما في حالة الفطر mushroom. وتكون جميع الفطريات مختلفة التغذية heterotrophic، حيث تعتمد في غذائها على المواد العضوية الميتة وتدعى بالكائنات الرمية saprobes أو تعتمد في تغذيتها على المواد العضوية الحية وتدعى بالكائنات الطفيلية parasites. وإن الفطريات لا تتناول غذائها بل تمتصه. إذ تعزز الأنزيمات اللازمة لتجزئة المواد الغذائية خارج الجسم. وتنتقل المواد الغذائية المهضومة جزئياً من خلال أغشية الفطريات. وإن لجميع الفطريات جدران خلوية، وإن معظمها يكوّن بعض الأنواع من الأبواغ spores. وتتألف مملكة الفطريات من ثلاث أقسام رئيسة هي:

★ قسم الفطريات المزدوجة Division Zygomycota (Zygomycetes):

إن معظم هذه الفطريات يكون رُمّياً saprophytic وأرضي المعيشة، ويتطفل البعض منها على النباتات والحشرات. ويؤدي التكاثر الجنسي إلى تكوين تركيب سميك الجدار يدعى zygospore. وتكون الخيوط الفطرية hyphae غير مقسمة بحواجز.

★ قسم الفطريات الكيسية Division Ascomycota (Ascomycetes):

ويمثل أكبر قسم في الفطريات حيث يشمل الخمائر yeasts والفطريات العفنية الذرورية powdery mildews والعفن molds والغوْشَنَه morels والكمأ truffles. وإن العديد من الفطريات الكيسية يسبب الأمراض. ويؤدي التكاثر الجنسي في أحوال كثيرة إلى تراكيب تدعى بالأثمار الكيسية أو الزقّية ascocarps.

★ الفطريات الدّعامية Division Basidiomycota (Basidiomycetes):

وهي عبارة عن فطريات أرضية تشمل الفطر mushroom . وتتكون الأبواغ الدّعامية basidiospores الجنسية على فروع خاصة تدعى بالدّعامات basidia.

وفضلاً عن الأقسام الثلاث الرئيسة للفطريات فإن هناك مجموعتين تتم الإشارة إليها في أحوال كثيرة ضمن الفطريات وهما: الفطريات الناقصة fungi imperfecti (الفطريات الثانوية Deuteromycetes) والأُشنات lichens. وإن للفطريات الناقصة العديد من خصائص الفطريات الكيسية إلا أنه في معظم الحالات لم يلاحظ التكاثر الجنسي. وإن العديد من هذه الفطريات يكون طفيلياً وممرضاً للنباتات والحيوانات وبضمنها الإنسان، مسببة إصابات الجلد والأغشية المخاطية (قوباء الجلد ringworm وهو مرض جلدي مُعدٍ، وقدم الرياضي athlete's foot وهو مرض جلدي يصيب الأقدام ناشىء عن فطر ينمو في السطوح الرطبة). وإن بعض الفطريات الناقصة يستخدم في إنتاج أجبان معينة (مثل جبن الروكفورت roquefort والكامبر camembert) وكذلك في إنتاج المضادات الحيوية وبضمنها البنسلين penicillin.

إن الأُشنات عبارة عن مجموعة كبيرة من الفطريات التي تعيش من خلال علاقة تبادل المنفعة مع الطحالب الخضراء أو البكتريا الخضراء الزرقاء. وإن الأشنات تتكون بشكل رئيس من الفطريات الكيسية وفي بعض الأحيان من الفطريات الدّعامية أو الفطريات الثانوية. ويكون جسم الأشنة متميزاً في مظهره. ويلاحظ وجود ثلاث أشكال رئيسة هي: القشرية crustose والورقانية foliose والشجيرية fruticose . وكثيراً ما تتضمن عملية التكاثر تكوين أبواغ كيسية (زقية) أو تكوين السوريديا soredia (وهي عبارة عن أجزاء صغيرة مكونة في الأقل من خلية طحلب واحدة محاطة بخيوط فطرية). وسيقوم كل طالب في هذا المختبر بدراسة مثال واحد يمثل الفطريات المزدوجة والكيسية والدّعامية والأشنات.

أ- قسم الفطريات المزدوجة Zygomycetes:

يعد عفن الخبز الأسود *Rhizopus stolonifer* أحد الأفراد الشائعة لهذا القسم والذي ينمو بشكل كتل شبيهة بالقطن على الخبز والفاكهة وبقية المواد العضوية الغنية بالكاربوهيدرات. وتبدأ الإصابة عندما ينمو البوغ spore الأحادي المجموعة الكروموسومية haploid مكوناً كتل من الخيوط الفطرية التي تتمايز إلى تراكيب تدعى بأشباه الجذور rhizoids التي تعمل على تثبيت الفطر على المادة الموجود عليه، وتفرز هذه التراكيب أنزيمات هضمية وتقوم بامتصاص المواد العضوية المهضومة جزئياً. كما وتتمايز الخيوط الفطرية مكونة حاملة الأكياس البوغية sporangiophores والتي هي عبارة عن خيوط فطرية هوائية تكوّن أكياس بوغية sporangia تحتوى على الأبواغ. وعندما تنضج هذه الأكياس البوغية فإنها تصبح سوداء وقد اشتق اسم الفطر من هذه الصفة.

١- التكاثر اللاجنسي Asexual Reproduction:

افحص عفن الخبز الأسود في طبق بتري. وإن هذا الفطر لا ينمو فقط على الخبز بل ينمو أيضاً على الأكار المحتوي على المواد العضوية المختلفة الضرورية لعملية النمو. خذ قطعة من الخبز وضعها في طبق بتري ثم رطبها ببضع قطرات من الماء. ضع قطعة صغيرة من العفن المأخوذ من الأكار على قطعة الخبز ثم ضع غطاء الطبق واتركه ليوم واحد أو يومين. وعند فحص العفن باستعمال المجهر التشريحي اترك الغطاء على طبق بتري لمنع تحرر الأبواغ إلى الهواء. لاحظ كتلة الخيوط البيضاء النامية على سطح الكار (الشكل-١١٣). ويدعى كل خيط بالخيط الفطري hypha، أما الكتلة الكلية للخيوط الفطرية فتدعى بالحصيرة الفطرية mycelium. وتنمو بعض الخيوط الفطرية إلى الأعلى مكونة تراكيب كروية سوداء صغيرة تدعى بالأكياس البوغية Sporagium (الشكل-١١٣) . وتحتوي الأكياس البوغية على الأبواغ والتي تتحرر عند انفتاح الأكياس البوغية. ما هي وظيفة الأبواغ؟.

هناك خيوط فطرية أخرى تخترق الأكار أو الخبز تدعى بأشباه الجذور والتي هي

عبارة عن خيوط فطرية صغيرة شبيهة بالجذور تنمو داخل الأكـار (الشـكل-١١٣). ما هي وظيفة أشباه الجذور ؟.

ضع قطعة صغيرة من العفن في قطرة ماء على شريحة زجاجية (الشكل-١١٣). ضع غطاء الشـريحة وافحـص العفـن تحـت المجهـر. حـدد مواقـع الأكيـاس البوغيـة والأبواغ والخيوط الفطرية وأشباه الجذور.

٢- التكـاثر الجنسـي Sexual Reproduction:

يحدث التكاثر الجنسي عند تقابل الخيوط الفطرية لضربين تزاوجيين أو اتحادها، وتنجذب هذه الخيوط نحو بعضها بتأثير الهرمونات المنتشرة من الخيوط. ويطلق علـى أحد الضربين التزاوجيين mating strains بالموجب (+) والآخر بالسالب (-) وذلـك لعدم وجود اختلافات مظهرية بينهما يمكن أن تميزهمـا علـى أنهمـا ضـربين ذكـري وأنثوي.

لقد حضّر المدرس لكل طالب طبق أكار يحتـوي علـى ضـرب موجـب وآخـر سالـب. وإن نمو هـذين الضـربين سـيجعلهما يقتربـان مـن بعضـهما. وعنـد منـاطق التماس تتكون تراكيب تدعى بخلايا الأمشاج gametangia تحتوي على نـوى موجبـة وأخرى سالبة (الشكل-١١٤). ويؤدي اتحاد خلايـا الأمشـاج إلى تكـوين خـط مـن الأبواغ zygospores السوداء السميكة الجدار (الشكل-١١٤). ويحتوي كل بوغ على عدة نوى ثنائية المجموعة الكروموسـومية. ويمكـن أن تبقـى الأبـواغ سـاكنة (سـابته) dormant لعدة أشهر. ويحدث الانقسام الاختزالي عادة قبل استنبات البوغ. وتتحلل جميع النوى الأحادية المجموعة الكروموسومية باستثناء نـواة واحـدة. ويتطـور الخـيط الفطري الهوائي مع تكـوين الكـيس البـوغي في قمـة الخـيط الفطـري. وإن الأبـواغ الأحادية المجموعة الكروموسومية المتكونة في الكيس البوغي يمكنها النمو عند تحريرها وبـدء دورة جديـدة. وبالإبقـاء علـى غطـاء الطبـق حـدد مواقـع الأبـواغ اللاقحيـة باستعمال المجهر التشريحي.

ب- قسم الفطريات الكيسية Ascomycetes:

إن معظم الفطريات الكيسية عندما تتكاثر جنسياً تكوّن أكياس asci (خلايا الانقسام الاختزالي meiocytes) داخل الأثمار الكيسية أو الزقية ascocarps.

١- الخمائر:

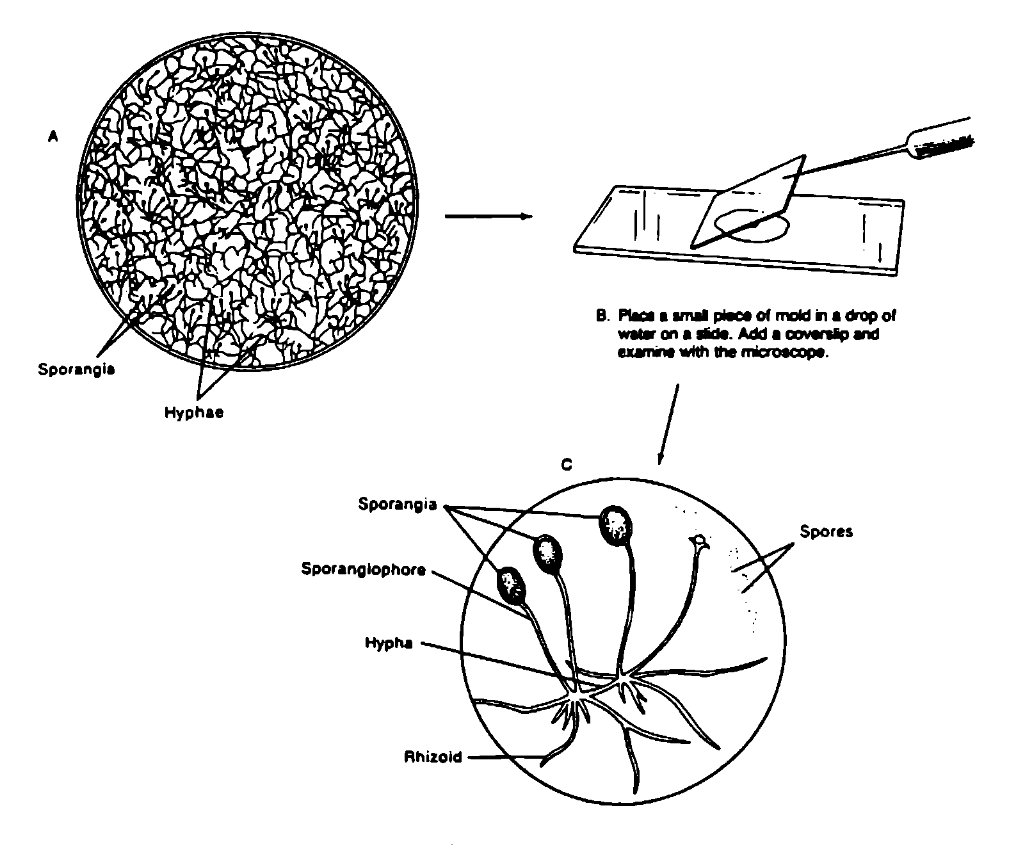
ضع بعض خلايا الخميرة الحية على شريحة وافحصها مجهرياً. لاحظ وجود النوى والحبيبات الغذائية الصغيرة المتلألأة (الشكل-١١٥). كما ويمكن ملاحظة وجود بعض خلايا الخميرة التي تحتوي على بروزات صغيرة دائرية تدعى بالبراعم buds (الشكل-١١٥). أي نوع من التكاثر تمثله هذه البراعم ؟.

في حالة عدم وجود خلايا متبرعمة افحص شريحة تُظهر هذه العملية. تصنف الخمائر ضمن الفطريات الكيسية وذلك لتكوين كيس في فترة من دورة حياتها. افحص شريحة توضيحية تُظهر كيس الخميرة ومحتوياته. عدد الطرق التي يمكن من خلالها أن تكون للخمائر أهمية تجارية للإنسان.

٢- الفطر العفني الذروري (Powdery Mildew (Microsphaera:

افحص أوراق نبات اللَيْلَك lilac المصابة بهذا الفطر. لماذا يدعى هذا الكائن الحي بالفطر العفني الذروري ؟.

إن الخيوط الفطرية المكونة للحصيرة الفطرية mycelium والنامية على سطح الورقة تخترق في بعض الأحيان خلايا البشرة (الشكل-١١٦). وتدعى هذه الخيوط الفطرية المخترقة لخلايا البشرة بمصات النبات الطفيلي haustoria (المفرد haustorium). ما هي وظيفة هذه المصات ؟. افحص شرائح توضيحية تُظهر اختراق المصات لخلايا البشرة في النبات المضيف. ما نوع التغذية في هذا الفطر؟.



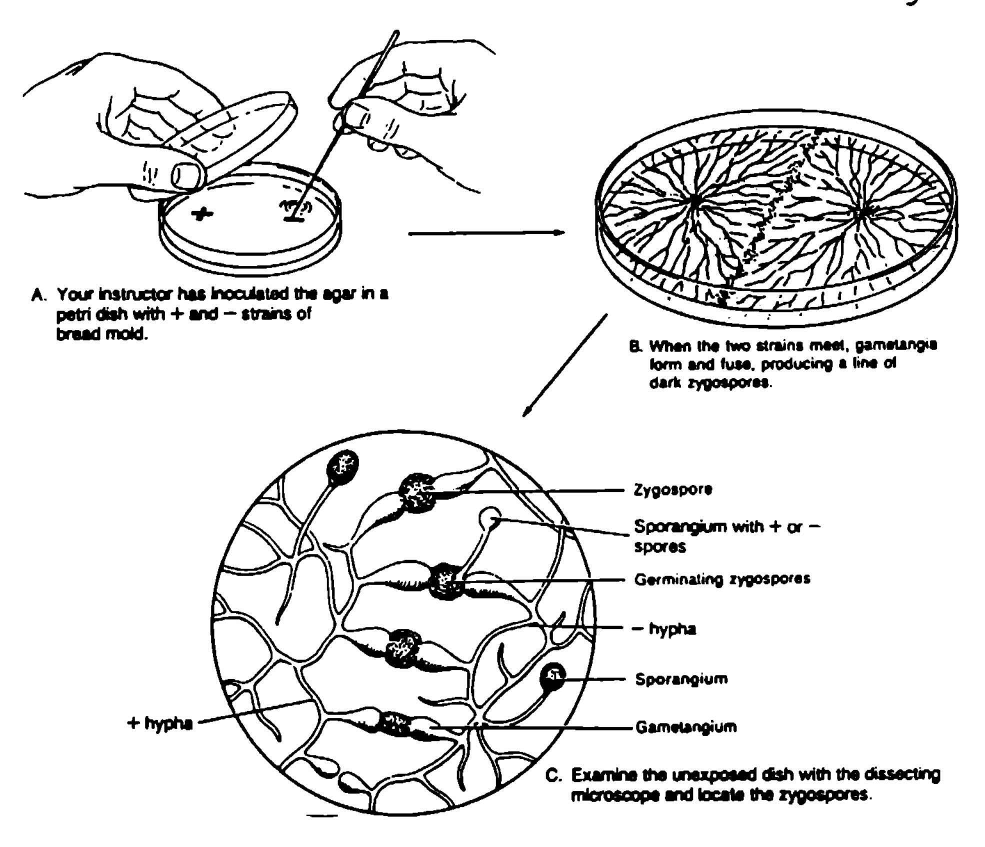
شكل – ١١٣: تركيب عفن الخبز الأسود *Rhizopus stolonifer*

تتكون في أواخر الربيع أعداد كبيرة من الأبواغ اللاجنسية تدعى بالغُبَيْرات conidia عند نهايات الخيوط الفطرية الهوائية المتخصصة، وتنتشر هذه الغُبَيْرات بواسطة الريح مؤدية إلى انتشار الإصابة إلى النبات نفسه أو إلى نبات لَيْلَك آخر شكل-١١٦.

افحص شرائح للفطر العفني الذروري وحدد مواقع الغُبَيْرات conidia.

عند الاقتراب من نهاية فصل الصيف تتكون أعداد كبيرة من أجسام ثمرية كروية تدعى بالأكياس المغلقة cleistothecia نتيجة لعملية التكاثر الجنسي (الشكل-١١٦، السفلي). افحص ورقة مصابة تحت المجهر التشريحي وحدد مواقع بعض هذه الأجسام الثمرية. اكشط سطح الورقة وضعه في قطرة ماء على شريحة زجاجية.

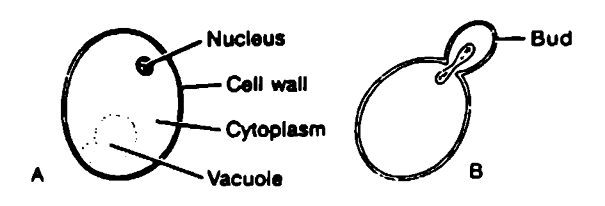
ضع غطاء الشريحة وافحص الشريحة تحت المجهر. حدد موقع الكيس المغلق ولاحظ الأجزاء الملحقة به. كيف يمكن الاستفادة من هذه الأجزاء الملحقة في نشر الفطر؟.

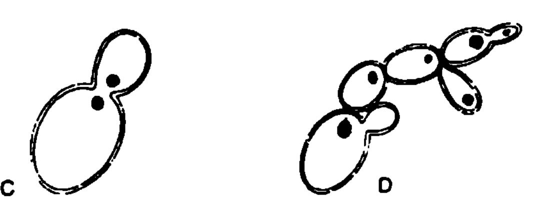


شكل – ١١٤: التكاثر الجنسي في عفن الخبز الأسود

اضغط على غطاء الشريحة بلطف في الوقت الذي تفحص فيه الكيس المغلق Cleistothecium ، ولاحظ الأكياس asci المتحررة. وحدد موقع الكيس المحتوي على الأبواغ الكيسية ascospores. ما هو عدد الأبواغ التي يحتويها الكيس ؟.

ماذا يصبح البوغ الكيسي بعد تحرره ؟.





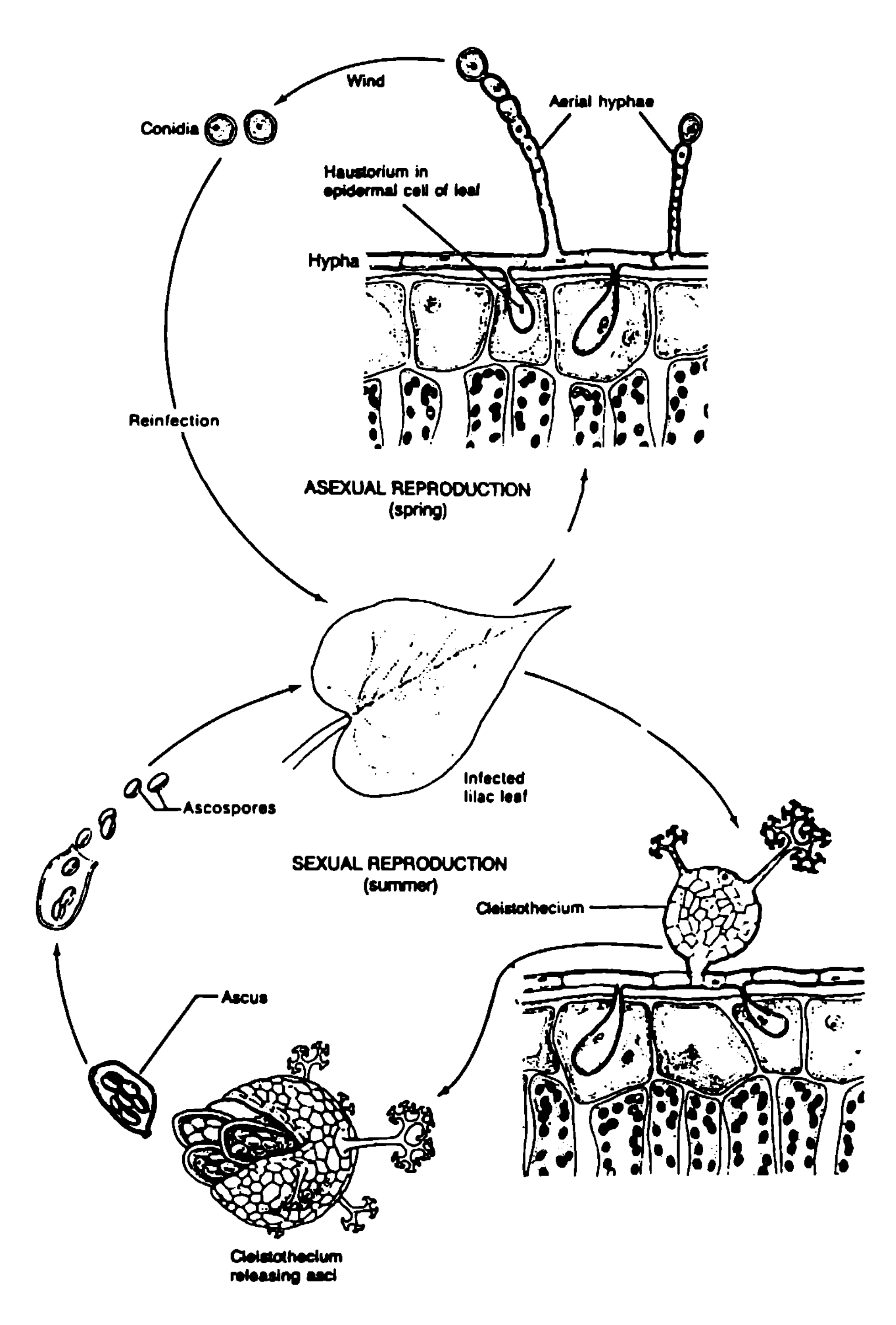
شكل – ١١٥: التبرعم في الخميرة

جـ- الفطريات الدّعامية Basidiomycota:

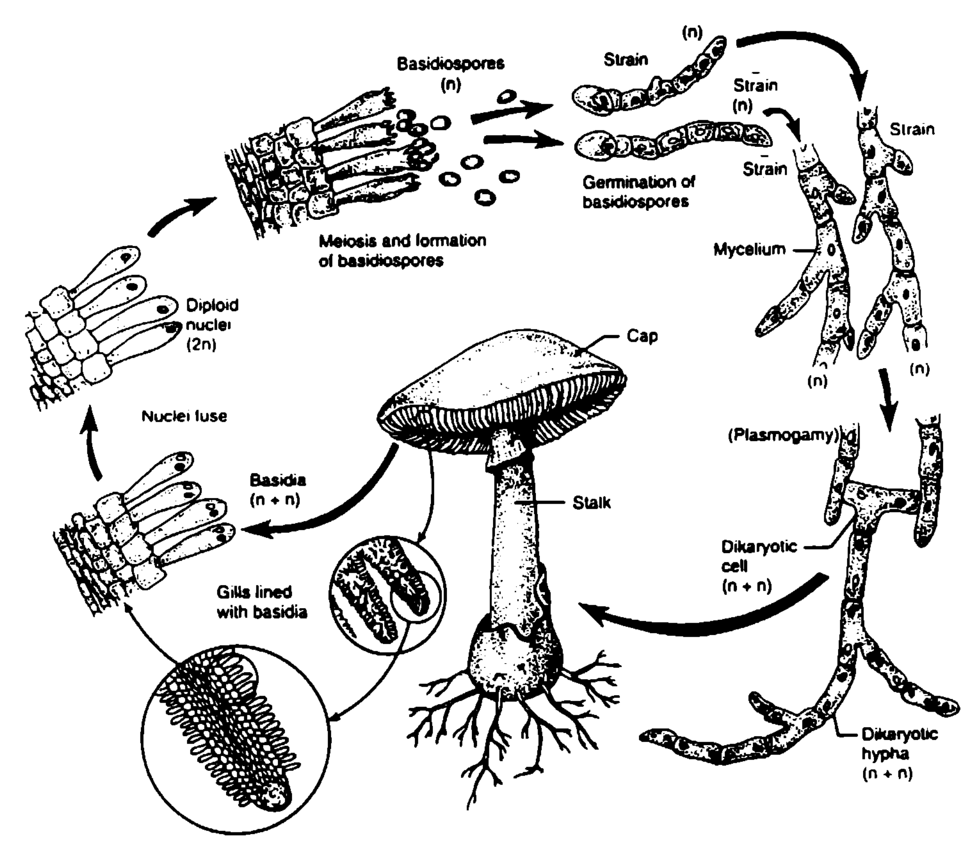
إن الفطريات الدّعامية عبارة عن مجموعة كبيرة من الكائنات الحية الرُّمية saprophytic والطفيلية parasitic. وتتكون الأبواغ الدّعامية من تراكيب مكونة من خلية واحدة إلى أربع خلايا. وتدعى هذه التراكيب بالدّعامات basidia والتي تتكون بأعداد كبيرة في عدة أنواع من الأجسام الثمرية المسماة بالأثمار الدّعامية basidiocarps. ومن الفطريات الواقعة ضمن هذه المجموعة الغاريقون toadstool والفطر mushroom وفطر السُّناج smut وفطر صدأ الحبوب rust.

الفطر Mushroom:

يتميز الفطر بوجود صفائح plates أو خياشيمgills على السطح السفلي للثمرة الدّعامية basidiocarp. وقبل تكوين مثل هذا الجسم الثمري فإن الحصيرة الفطرية الأولية المحتوية على النوى الأحادية المجموعة الكروموسومية ستنمو تحت سطح المادة الموجودة عليها. وعند اتحاد الضروب المختلفة للحصيرة الفطرية الأحادية المجموعة الكروموسومية تتكون حصيرة فطرية ثانوية ثنائية النوى dikaryotic (خلايا محتوية على نواتين أحاديتي المجموعة الكروموسومية). وقد يكوّن هذا الخيط الفطري ثمرة دعامية تدعى بالفطر mushroom مكونة من سويق stalk وقلنسوة cap.



شكل – ١١٦: دورة حياة powdery mildew.



شكل – ١١٧: دورة حياة فطر mushroom

افحص الثمرة الدِّعامية للفطر التجاري *Agaricus capmestris*. لاحظ السويق والقلنسوة. افحص السطح السفلي للقلنسوة وحدد موقع الخياشيم. وعندما يكون الفطر فتياً فإن الخياشيم تكون مغطاة بغشاء رقيق يمتد من السويق إلى الحافة الخارجية للقلنسوة.

يلاحظ في دورة حياة الفطر إن النواة الثنائية المجموعة الكروموسومية في الدِّعامات تمر بانقسام اختزالي مكونة أربعة نوى أحادية المجموعة الكروموسومية يتم ادخالها فيما بعد ضمن الأبواغ الدِّعامية (الشكل-١١٧). وينمو كل بوغ مكوناً حصيرة فطرية أحادية المجموعة الكروموسومية تتحد مع أخرى لتكوين حصيرة فطرية ثنائية النوى. وتنشأ الثمرة الدِّعامية من الحصيرة الفطرية الثانوية.

ضع إحدى الخياشيم في قطرة ماء على شريحة زجاجية وافحص حافاتها مجهرياً. حدد مواقع الدّعامات والأبواغ الدّعامية. افحص شرائح جاهزة (في حالة توفرها) للفطر *Coprinus* يُظهر مقطعاً عرضياً للقلنسوة. حاول التعرف على الخياشيم والدّعامات والأبواغ الدّعامية.

٢- فطريات الأشجار Bracket Fungi:

تعيش هذه الفطريات بشكل طفيلي أو رُمّي على الأشجار المختلفة. ويمكن للحصيرة الفطرية أن تنمو في جذع الشجرة لعدة سنوات قبل تكوينها للجسم الثمري الخشبي woody fruiting body المميز لها على الجزء الخارجي من الشجرة. افحص عدداً من فطريات الأشجار ولاحظ طبقات النمو المتعددة. وكيف يمكن الاستفادة من طبقات النمو هذه في تحديد عمر فطريات الأشجار ؟.

افحص أحد الأجسام الثمرية باستعمال المجهر التشريحي. كيف يختلف فطر الأشجار الواقع تحت السطح عن الفطر mushroon ؟.

افحص شريحة جاهزة توضح مقطعاً عرضياً في الجسم الثمري لفطر الأشجار.

ماذا تمثل الفتحات الدائرية الموجودة في المقطع العرضي ؟.

حدد موقع الدّعامات والأبواغ الدّعامية.

٣- فطريات صدأ الحبوب Rusts:

وهي عبارة عن مجموعة من الفطريات الدّعامية الطفيلية التي تصيب العديد من النباتات البذرية وكذلك بعض النباتات السّرخسية ferns (الخنشاريات). وإن جميع أنواع فطريات صدأ الحبوب تكوّن في الأقل نوعين متميزين من الأبواغ والبعض الآخر يكوّن ثلاثة أو أربعة أو خمسة أنواع. وإن من أكثر أنواع فطريات صدأ الحبوب المعروفة والذي يسبب خسائر اقتصادية كبيرة هو فطر صدأ الحنطة *Puccinia graminis*. وتؤثر الإصابة بهذا الطفيلي على نبات الحنطة بعدة طرق:

١- يموت العديد من خلايا المضيف بواسطة الفطر وذلك لأنه يستخدم محتويات الخلايا لغرض نموه.

٢- إن الفطر يأخذ غذاء المضيف.

٣- تنخفض فعالية عملية التركيب الضوئي في خلايا النبات نتيجة لقتل الفطر لخلايا النبات المحتوية على البلاستيدات الخضراء لذا تؤدي الإصابة بفطر *Puccinia* إلى تغير لون نبات الحنطة إلى الأخضر الشاحب وتوقف نموه مع نضج الحنطة قبل أوانها، إذ يلاحظ انكماش حبوب الحنطة kernels وصغر حجمها ومحدودية مخزونها الغذائي.

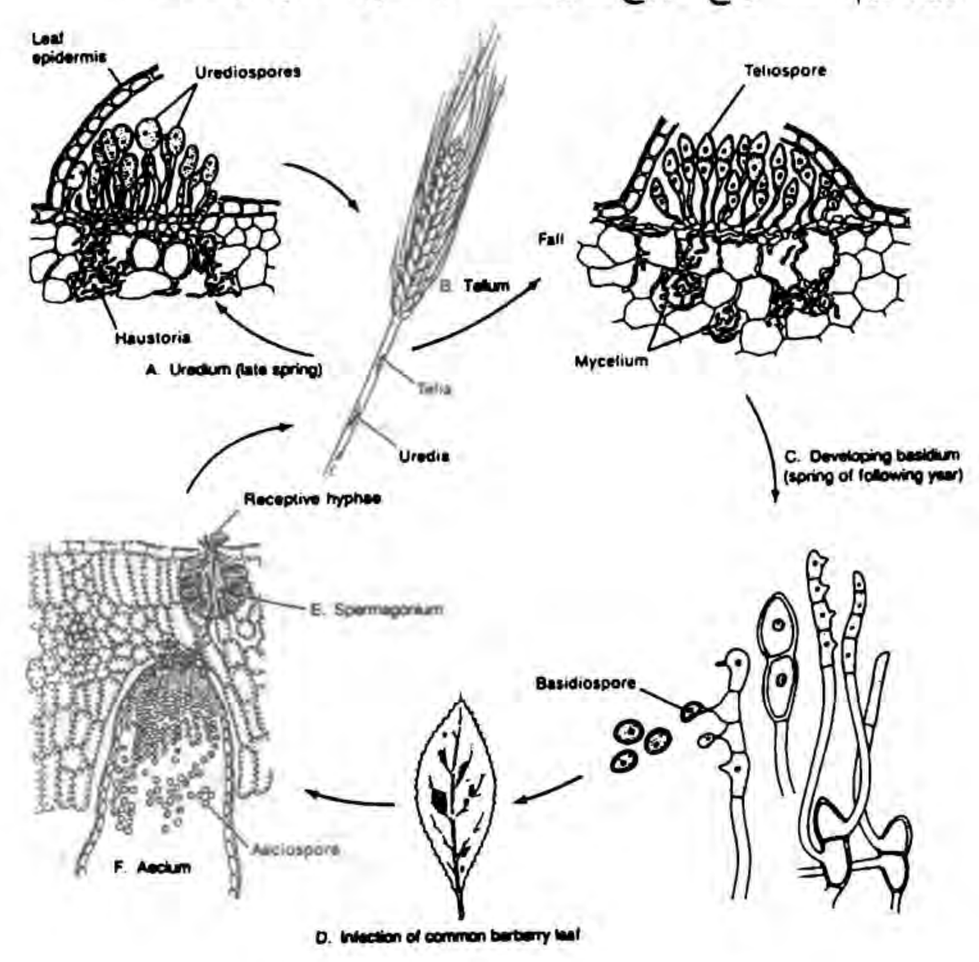
أ- مراحل فطر صدأ الحبوب في نبات الحنطة:

الأبواغ المسببة للتلف (أبواغ الآفة الزراعية) Urediospores

افحص سيقان نبات الحنطة وأوراقه التي تُظهر وجود بقع حمراء على السطح - ومنها جاء اسم فطر صدأ الحبوب rust -. وتدعى هذه البقع باليوريديا uredia (المفرد يوريديوم uredium) والتي تحتوي على أعداد كبيرة من الأبواغ المسببة للتلف الحمراء البرتقالية الثنائية النوى (الشكل-١١٨). وتعد هذه الأبواغ أحد النوعين الذي يظهر في أواخر الربيع. وتتكون الأبواغ المسببة للتلف خلال معظم فصل النمو لحين نضج النبات. وتنتقل الأبواغ المسببة للتلف بوسائل متنوعة (الريح بشكل رئيس) إلى بقية نباتات الحنطة حيث تنمو الأبواغ وترسل خيوطها الفطرية من خلال الثغور stoma الموجودة على الأوراق إلى الفسح الموجودة بين خلايا الورقة. وتتشعب الحصيرة الفطرية بشكل كبير.

وتخترق الممصات haustoria خلايا المضيف لامتصاص الغذاء. وبعد فترة من النمو تكوّن كتلة الخيوط الفطرية طبقة من الخلايا تحت البشرة مباشرة، تتطور بعدها إلى الأبواغ المسببة للتلف ذات السويقات. وتتكون هذه الأبواغ بأعداد كبيرة تؤدي بالنتيجة إلى تحطم البشرة. اكشط باستعمال شفرة حلاقة كمية قليلة من اليوريديا وضعها في قطرة ماء على شريحة زجاجية ثم ضع غطاء الشريحة. افحص وحدد

مواقع بعض الأنواع المسببة للتلف. بعد ذلك افحص شريحة لمقطع عرضي خلال اليوريديوم. حدد مواقع الأبواغ المسببة للتلف والحصيرة الفطرية والممصات.



شكل – ١١٨: دورة حياة صدأ الحنطة wheat rust.

الأبواغ النهائية Teliospores:

عندما يقترب نبات الحنطة من النضج تبدأ الحصيرة الفطرية في هذه المرحلة بتكوين الأبواغ النهائية (الشكل–١١٨) الواقعة داخل كتل تدعى بالتيليا telia. وإن لهذه الأبواغ جدران أسمك من جدران الأبواغ المسببة للتلف urediospores، وإن الأبواغ النهائية لا تنبت في العادة حتى الربيع التالي بعد نضج الحنطة.

اكشط كمية قليلة من المادة المحتوية على التيليا من ساق أو ورقة نبات الحنطة وضع

ها في قطرة ماء على شريحة زجاجية. ضع غطاء الشريحة وافحص العينة تحت المجهر. افحص وحدد مواقع الأبواغ النهائية. ما هو عدد الخلايا المكونة لكل بوغ نهائي؟.

افحص شريحة تحتوي على مقطع طولي خلال التيليوم telium. حدد مواقع الأبواغ النهائية غير الناضجة والتي عند تكونها في البداية تكون ثنائية النوى، ثم حدد مواقع الأبواغ النهائية الناضجة التي اتحدت فيها النوى الثنائية.

ب- مراحل فطر صدأ الحبوب في نبات Barberry:

في ربيع السنة التالية تمر نوى الخلايا المكونة للبوغ النهائي بعملية الانقسام الاختزالي، إذ تحتوي على بعدها كل خلية على أربع نوى أحادية المجموعة الكروموسومية.

وتكوّن كل خلية خيط فطري قصير يتطور إلى دعامة basidium رباعية الخلايا. إذ تنتقل النوى إلى الدّعامة وإن كل خلية منها تحتوي على نواة أحادية المجموعة الكروموسومية. وإن كل خلية في الدّعامة تكوّن بروز صغير تنتقل إليه النواة. وإن النهاية المنتفخة لهذا البروز تصبح بشكل بوغ دعامي basidiospore.

يحتاج فطر صدأ الحنطة إلى مضيف بديل لإكمال دورة حياته. وإن الأبواغ الدّعامية لا يمكنها إصابة الحنطة ثانية، بل يمكنها إصابة المضيف البديل فقط وهو نبات البَرْباريس barberry (الشكل-١١٨). فعندما يسقط البوغ الدّعامي على ثمرة أو غصن أو ورقة البرباريس فإنه سينبت مكوناً خيطاً فطرياً يخترق النسيج. وتتكاثر الحصيرة الفطرية في النسيج بشكل واسع.

ويتكون في النهاية نوعين من التراكيب هما: السبيرماكونيا spermagoina (المفرد سبيرماكونيوم spermagonium) والإيشيا aecia (المفرد إيشيوم aecium) (الشكل-١١٨). ويمكن ملاحظة هذه التراكيب في المقاطع الطولية لها.

السبيرماكونيوم Spermagonium:

وهو عبارة عن تركيب دورقي الشكل يقع أسفل البشرة مباشرة. ويحتوي على العديد من الخيوط الفطرية الشبيهة بالشعر التي تحتوي نهاياتها على خلايا شبيهة بالأبواغ تدعى بالسبيرماشيا spermatia (المفرد سبيرماشيوم spermatium). ويتم نقل السبيرماشيا بواسطة الحشرات إلى خيوط الاستقبال الفطرية receptive hyphae البارزة من السبيرماتوكونيا Spermatagonia الأخرى حيث تدخل النواة من السبيرماشيوم إلى خيط الاستقبال الفطري. وهذا يؤدي إلى حدوث تطور لنوع آخر من الحصيرة الفطرية التي تكوّن فيما بعد إيشيا aecia شبيهة بالكأس تبرز من السطح السفلي لورقة البرباريس (الشكل-١١٨).

الأيشيوم Aecium:

تتكون كتل من أبواغ الإيشيا aeciospores داخل الإيشيا (الشكل-١١٨). وعند نقل هذه الأبواغ بواسطة التيارات الهوائية إلى أوراق الحنطة أو سيقانها فإنها تنبت مكونة حصيرة فطرية داخل الخلايا والتي تكوّن الأبواغ المسببة للتلف urediospores لإكمال دورة الحياة. افحص أوراق البرباريس مصابة وحدد مواقع السبيرماكونيا Spermagonia والإيشيا aecia. وافحص بعد ذلك شرائح توضح المقاطع الطولية لهذه التراكيب. حدد مواقع السبيرماشيا وخيوط الاستقبال الفطرية وأبواغ الإيشيا.

كيف يمكنك السيطرة على انتشار الفطر كفطر صدأ الحنطة والذي تنتقل فيه الأبواغ المُعدية بواسطة تيارات الهواء لإصابة النباتات التي تبعد آلاف الأميال عن موقع هذه الأبواغ ؟.

د- الفطريات الناقصة Fungi Imperfecti:

إن معظم التلف الذي يصيب الأغذية والجلود والملابس يعود سببه للفطر بنسيليوم *Penicillium* . افحص مزرعة حية لفطر البنسيليوم. لماذا يدعى هذا الفطر في بعض الحالات بالعفن الأزرق المخضر blue – green mold .

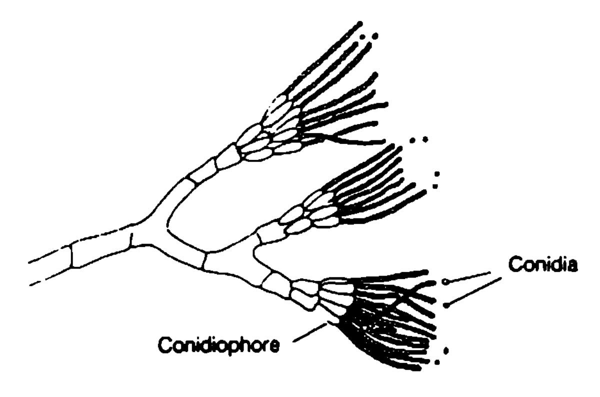
افحص شرائح جاهزة توضح تشعبات الخيوط الفطرية المكونة للأبواغ اللاجنسية أو الغُبَيْرات conidia (الشكل-١١٩). كيف يختلف البنسيليوم عن عفن الخبز بطريقة تكوين الأبواغ ؟.

ما هو التشابه بين البنسيليوم والمايكروسفيرا ؟.

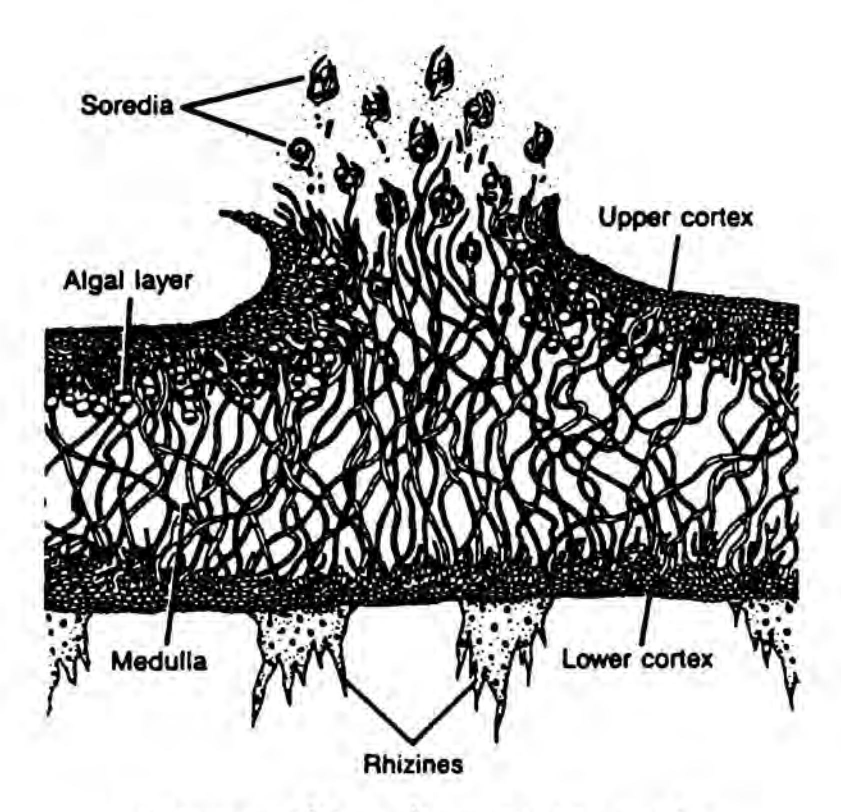
يقوم أحد أنواع البنسيليوم *Penicillium notatum* بتكوين المضاد الحيوي المعروف بالبنسلين، والذي يعد من المضادات الحيوية الفعالة في مواجهة الإصابات البكتيرية.

هـ- الأشنات Lichens:

تدعى الأُشنات بالنباتات الرائدة (الممهدة للطريق) pioneer plants وذلك لأنها تنمو في أحيان كثيرة على الصخور العارية، وتعد أولى النباتات التي تغطي المناطق المحروقة. ولا تعد الأُشنات من النباتات، بل أنها تعيش بمشاركة تكافلية symbiotic partnership بين الفطر (عادة فطر كيسي ascomycete) والطحلب الأزرق المخضر ونظراً لقابلية الأُشنات على الحصول على غذائها من النباتات التي تقوم بعملية التركيب الضوئي فإنها غزت البيئات الجافة في العالم. وإنها توجد في المناطق الصحراوية القاحلة والقطبية الشمالية، وتنمو في الأراضي الخالية وجذوع الأشجار والصخور وتحت الماء.



شكل – ١١٩: الكونيديا Conidia للبنسيليوم محمولة على Conidiophore



شكل – ١٢٠: التركيب المجهري للأشنات Lichens

١- المميزات الخضرية Vegetative Features:

يتميز جسم الأُشنات (الثالوس thallus) بمظهره، وتصنف الأشنات بشكل كبير تبعاً لشكل نموها. وفيما يأتي وصفاً لثلاث أنواع رئيسة من الثالوس المتكون.

* القشري crustose: وينمو بشكل منبطح على المادة الموجودة عليها بحيث يكون السطح العلوي مرئياً فقط.

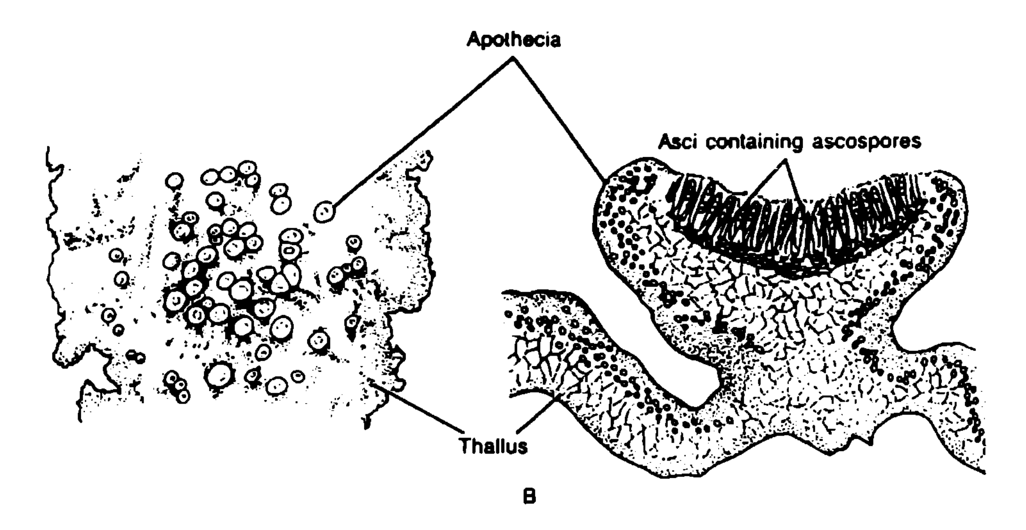
* الورقاني foliose: ويرتبط مع المادة الموجودة عليها substrate بشكل مفكك بحيث يكون سطحيه العلوي والسفلي مرئياً.

* الشجيري fruticose: ويرتبط بنقطة معينة مع المادة الموجود عليها وينمو بشكل قائم.

افحص الأشنات المختلفة بالعين المجردة وباستعمال المجهر التشريحي. ومن خلال الوصف المذكور سابقاً حدد نوع الثالوس وسجل ملاحظاتك في الجدول-٤٩.

الجدول-٤٩: تصنيف النمو الخضري للأُشنة

الاسم	نوع الثالوس



شكل – ١٢١:

(أ) يوضح وجود apothecia على الأشنات.

(ب) مقطع في apothecium يوضح وجود asci الحاوية على السبورات ascospores.

٢- التشريح المجهري Microscopic Anatomy:

اعمل مقطع عرضي دقيق خلال الثالوس الورقاني أو القشري للأشنة باستعمال شفرة حلاقة حادة، أو استعمل شرائح جاهزة. حدد مواقع الأجزاء الآتية مجهرياً بالاستعانة بالشكل-١٢٠.

القشرة العليا Upper Cortex:

وهي عبارة عن تجمع وقائي كثيف للخيوط الفطرية.

طبقة الطحلب Algal Layer:

وهي عبارة عن طبقة من الخلايا الطحلبية وكتل متشابكة من الخيوط الفطرية رقيقة الجدار.

اللب Medulla:

وهي عبارة عن طبقة سميكة نوعما مكونة من خيوط فطرية عديمة اللون متشابكة بشكل مفكك. وتؤلف هذه الطبقة ما يقارب ثلثي الثالوس ويعتقد بأنها تعمل منطقة خزن.

القشرة السفلى Lower Cortex:

وتكون هذه الطبقة أرق من القشرة العليا، وتحتوي على بروزات تدعى بالجذور الصغيرة rhizines التي تعمل على ربط الأشنة بالمادة الموجودة عليها .

٣-التكاثر اللاجنسي Asexual Reproduction:

افحص عينات مختلفة تحت المجهر التشريحي وحاول العثور على كتل حبيبية صغيرة على السطح تدعى بالسوريديا soredia. وتحتوي هذه السوريديا على خلية طحلبية واحدة أو أكثر محاطة بخيوط فطرية. وتنتشر السوريديا بواسطة الريح أو المطر، وإن كل سوريديا واحدة لها القابلية على النمو لتكوين ثالوس أشني جديد.

اكشط بعض السوريديا وضعها في قطرة من هيدروكسيد البوتاسيوم (أو أي مادة مرطبة) وافحصها تحت المجهر المركب، اكمل معلوماتك بدراسة شرائح جاهزة لثالوس الأُشنة (الشكل-١٢٠).

٤-التكاثر الجنسي Sexual Reproduction

حاول اختيار أشنة تحتوي على تراكيب صغيرة كأسية الشكل على سطحها تدعى بأوعية الأبواغ apothecia (الشكل-١٢١). اعمل مقطع طولي في وعاء الأبواغ وافحصه مجهرياً أو افحص شريحة جاهزة. حدد مواقع الأكياس المتطاولة elongated asci (الشكل-١٢١). ما هو عدد الأبواغ الموجودة في كل كيس ؟ وكيف تترتب ؟.

أي أنواع الأشنات التكافلية تتكاثر جنسياً ؟. وضح ذلك.

المــــراجــع

1- Abramoff, P. and Thomson, R. G.: Laboratory outlines in Biology, W. H. Freeman and Company, New York (1994).

2- Gunstream, S. E.: Explorations in Basic Biology Seventh Edition, Prentice Hall, New Jersey (1996).

3- Mader, S. S.: Biology, Fourth Edition, Laboratory Manual, prepared by K. S. Kilborn, Dubunque (1993).

4- Jones, A., Reed, R. and Weyers, J.: Practical skills in Biology, Second Edition, Longman, England (1998).

5- Gunstream, S. E.: Biological Explorations, Third Edition, Prentice Hall, New Jersey, (1997).

6- Morgan, J. G. and Carter, M. E. B.: Investigating Biology Second Edition, The Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc. California, (1996).